



# Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia

*Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de  
1,4-di-N-óxido de quinoxalina como agentes antimaláricos y  
leishmanicidas*

*Carlos Alfonso Barea Ripoll*





Universidad de Navarra  
Facultad de Farmacia

*Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina como agentes antimaláricos y leishmanicidas*

Memoria presentada por D. Carlos Alfonso Barea Ripoll para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de I+D+i de Medicamentos y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 10 de Diciembre de 2012

Dr. Ignacio Aldana Moraza



**Este trabajo ha sido desarrollado en la Unidad de I+D+i de Medicamentos del Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada (C.I.F.A.) de la Universidad de Navarra, perteneciente a uno de los proyectos de investigación que dirigen el Dr. Antonio Monge Vega y el Dr. Ignacio Aldana Moraza, Doctores en Ciencias Químicas.**



**El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado gracias a la concesión de la “Ayuda al Personal Investigador en Formación” concedida por la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.**





## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Antonio Monge por enseñarme el camino y hacerme crecer como investigador y como persona.

Al Dr. Ignacio Aldana por concederme la oportunidad de participar en este proyecto y guiarme durante estos cuatro años en el mundo de la investigación.

A la Dra. Silvia Pérez-Silanes por su ayuda y coordinación en los proyectos del grupo.

A la Dra. Silvia Galiano por los innumerables consejos que me ha dado durante todo este tiempo.

A la Dra. Carmen San Martín por su coordinación en la mejora del funcionamiento del laboratorio.

A Elsa y a Torres, por sus consejos y ayuda en el laboratorio desde el primer día; sin vosotros todo hubiese sido más difícil.

A mis amigos y amigas dentro y fuera del laboratorio: Álvaro, Gurbindo, Ylenia, Iranzu y Xandra; a pesar de estar tan lejos, me habéis hecho sentir como en casa.

A los demás compañeros del laboratorio todos estos años: Roberto, Asun, Ana, Mery Jhenny, Elena, Esther, Dani, Marta, Bea, Vero, Pilar, Nerea, Saioa, Iosu, Enrique, Adela, Mikel, Aleix, Gorka y Guillermo, gracias a todos, me habéis hecho mucho más agradable la estancia en el laboratorio.

A Carmen Elizalde por optimizar mi trabajo en el laboratorio con sus puntos verdes/negros, y su ayuda en la realización de los análisis.

A Rosa por enseñarme los entresijos del laboratorio y por sacarme una sonrisa diaria en los momentos de asueto.

A Miguel Quiliano por ayudarme en los estudios computacionales y publicaciones.

Al Dr. Eric Deharo y a la Dra. Adriana Pabón por la realización de los ensayos biológicos y su colaboración en las publicaciones.

A mis amigos de Pamplona de todos estos años: Fernando, Jorge, David, Ismael, Raúl, Lourdes, Docampo, Eva, Axel y Dani; gracias por hacerme disfrutar de vuestra compañía.

A la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra por concederme la beca que ha hecho posible este trabajo.

A mis amigos de Algeciras y a mi familia por ser mi apoyo en todo momento, y en especial a mis padres y a mi abuela; todo lo que soy os lo debo a vosotros.

**ABREVIATURAS**

<b>TDR</b>	Tropical Disease Research
<b>a. C.</b>	antes de Cristo
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	factor de necrosis tumoral alfa
<b>DDT</b>	dicloro difenil tricloroetano
<b>DEET</b>	<i>N,N</i> -dietil-meta-toluamida
<b>ATP</b>	adenosin trifosfato
<b>CQ</b>	cloroquina
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	ión férrico
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	ión calcio
<b>pH</b>	potencial de hidrógeno
<b>ELISA</b>	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>ADP</b>	adenosin difosfato
<b>SH</b>	grupo tiol
<b>VIH</b>	virus de la inmunodeficiencia humana
<b>Cu(II)</b>	ión cúprico
<b>BFX</b>	benzofuroxano
<b>QX</b>	quinoxalina
<b>T<sup>a</sup> amb.</b>	temperatura ambiente
<b>atm</b>	atmósfera
<b>RMN</b>	resonancia magnética multinuclear
<b>SeO<sub>2</sub></b>	dióxido de selenio
<b>KBr</b>	bromuro potásico

<b>NaCl</b>	cloruro sódico
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	dimetil sulfóxido deuterado
<b>% v/v</b>	porcentaje volumen-volumen
<b>W</b>	vacios
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>Log</b>	logaritmo
<b>FBS</b>	suero fetal bovino
<b>PBS</b>	tampón fosfato salino
<b>NEAA</b>	aminoácidos no esenciales
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromado
<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>%ABS</b>	porcentaje de absorción
<b>TPSA</b>	área topológica de superficie polar
<b>n-RT</b>	enlaces rotables
<b>vdW</b>	van der Waals
<b>Ar</b>	arómico
<b>Anf B</b>	anfotericina B

**ÍNDICE**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I. ENFERMEDADES OLVIDADAS</b>	3
<b>II. MALARIA</b>	7
1. Definición	9
2. Historia de la Malaria	9
3. Epidemiología	10
3.1 Distribución e incidencia	10
3.2 Factores epidemiológicos e inmunidad	12
4. El agente causante: <i>Plasmodium</i>	13
5. El vector de transmisión: <i>Anopheles</i>	14
6. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	15
7. Sintomatología	16
8. Detección y diagnóstico	19
9. Medidas de control y prevención de la malaria	20
10. Tratamiento	21
10.1 Historia del tratamiento	21
10.2 Clasificación de los compuestos antimaláricos	22
11. Resistencia a terapias actuales	29
12. Tratamientos actuales	30
13. Nuevas estrategias en la prevención y tratamiento de la malaria	32
13.1 Búsqueda de nuevas dianas	32
13.2 Productos naturales	32
13.3 Desarrollo de vacunas	33
<b>III. LEISHMANIASIS</b>	35
14. Definición	37
15. Historia de la leishmaniasis	37
16. Epidemiología: distribución e incidencia	38
17. El agente causante: <i>Leishmania</i>	40
18. Vectores de transmisión: <i>Phlebotomus</i> y <i>Lutzomyia</i>	42

19. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	43
20. Tipos de <i>Leishmania</i> y sintomatología .....	45
21. Detección y diagnóstico.....	48
22. Medidas de control y prevención de la leishmaniasis.....	49
23. Tratamiento.....	50
24. Tratamientos actuales .....	55
IV. QUINOXALINAS. FRAGMENTO PRIVILEGIADO EN MALARIA Y LEISHMANIASIS .....	57
25. Quinoxalinas, una estructura química con un amplio rango de actividades biológicas .....	59
26. Derivados de 1,4-di- <i>N</i> -óxido de quinoxalina y malaria .....	62
27. Derivados de 1,4-di- <i>N</i> -óxido de quinoxalina y leishmaniasis .....	64
<b>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>67</b>
V. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	69
VI. OBJETIVOS.....	73
VII. PLAN DE TRABAJO .....	77
28. Revisión bibliográfica .....	79
29. Diseño de nuevos derivados de 1,4-di- <i>N</i> -óxido de quinoxalina .....	79
30. Síntesis de los compuestos diseñados.....	83
31. Caracterización estructural de los compuestos sintetizados .....	84
32. Evaluación biológica <i>in vitro</i> de los derivados sintetizados .....	84
33. Estudio de relación estructura-actividad de los nuevos compuestos obtenidos .....	84
34. Búsqueda de nuevos compuestos líder y optimización en el diseño de nuevos derivados .	84
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>85</b>
VIII. SÍNTESIS QUÍMICA .....	87
35. Esquema general de síntesis .....	89
36. Química de los benzofuroxanos.....	90
36.1 Síntesis de benzofuroxanos .....	90
36.2 Posición de los isómeros de benzofuroxanos 5(6)-monosustituídos .....	93
37. Química de los derivados de quinoxalina di- <i>N</i> -óxido.....	94
37.1 Síntesis de derivados de quinoxalina di- <i>N</i> -óxido. La reacción de Beirut .....	94
37.2 Posición de los isómeros de quinoxalinas 6(7)-monosustituídas.....	96

38. Química de los compuestos finales (series 1-7).....	98
38.1 Formación de amidas y sulfonamidas (series 1-2, 4-5) .....	98
38.2 Doble <i>N</i> -acilación de aminas (serie 3) .....	99
38.3 Condensación y ciclación de tiosemicarbazida con los intermedios de reacción (serie 6).....	99
38.4 Formación de iminas (serie 7) .....	100
IX. QUÍMICA EXPERIMENTAL.....	101
39. Material y reactivos .....	103
40. Métodos generales de síntesis.....	105
40.1 Método A. Métodos generales de síntesis de benzofuroxanos .....	105
40.2 Método B. Métodos de síntesis de los derivados de 1,4-di- <i>N</i> -óxido de quinoxalina.....	108
40.3 Método C. Método de síntesis de los compuestos de la serie 1.....	110
40.4 Método D. Método de síntesis de los compuestos de las series 2, 4 y 5.....	111
40.5 Método E. Método de síntesis de los compuestos de la serie 3 .....	112
40.6 Método F. Método de síntesis de los compuestos de la serie 6 .....	113
40.7 Método G. Método de síntesis de los compuestos de la serie 7.....	113
X. ENSAYOS BIOLÓGICOS .....	115
41. Evaluación de la actividad antimalárica <i>in vitro</i> .....	117
42. Evaluación de la actividad leishmanicida <i>in vitro</i> .....	118
43. Evaluación de la toxicidad en leishmaniasis.....	119
XI. ESTUDIOS COMPUTACIONALES .....	121
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>125</b>
XII. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS .....	127
XIII. ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA .....	179
44. Resultados de actividad antiplasmódica <i>in vitro</i> .....	181
45. Discusión de la actividad antiplasmódica <i>in vitro</i> .....	187
XIV. ACTIVIDAD LEISHMANICIDA .....	189
46. Resultados de toxicidad y actividad leishmanicida <i>in vitro</i> .....	191
47. Discusión de la toxicidad y actividad leishmanicida <i>in vitro</i> .....	197
48. Discusión de la selectividad de los compuestos por las actividades evaluadas .....	200

XV. ENSAYOS COMPUTACIONALES .....	203
49. Resultados y discusión de los ensayos computacionales .....	205
<b>CONCLUSIONES</b>	209
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	213
<b>ANEXOS</b>	233



# **INTRODUCCIÓN**



# **I. ENFERMEDADES OLVIDADAS**



Tanto la malaria como la leishmaniasis están englobadas dentro de las denominadas “enfermedades olvidadas”, término que fue introducido en el vocabulario de reuniones de salud pública y global en los primeros años del siglo XXI. Sin embargo, aunque no hay una definición estándar para este término, dos publicaciones identifican las características comunes de lo que generalmente se incluye en el colectivo “enfermedades olvidadas”:<sup>1</sup>

- “enfermedades que afectan principalmente a personas pobres en países en vías de desarrollo, en las que las intervenciones sanitarias son inadecuadas a las necesidades”;<sup>2</sup>
- “un grupo de predominantemente, aunque no exclusivamente, enfermedades infecciosas tropicales, las cuales son medicamente diversas pero que comparten la característica de ser enfermedades de pobreza”.<sup>3</sup>

La mayoría de autores consideran a las enfermedades olvidadas, en términos de investigación y desarrollo de fármacos, como una serie de enfermedades infecciosas tropicales cuyos principales ejemplos son la malaria, la leishmaniasis, la enfermedad de Chagas y la tuberculosis.<sup>4</sup>

Las enfermedades olvidadas son un problema de salud pública y por lo tanto un desafío que debe ser afrontado, cuyo principal objetivo es la búsqueda de nuevas herramientas como vacunas, nuevos fármacos y métodos de diagnóstico.

Según el Programa Especial para la Investigación de Enfermedades Tropicales (TDR), la leishmaniasis está clasificada como enfermedad emergente e incontrolada, mientras que la malaria forma parte del grupo de enfermedades con estrategias de control disponibles pero cuya incidencia persiste. Por otro lado, según la clasificación con respecto al agente causante de la enfermedad, ambas quedan englobadas en aquellas causadas por parásitos protozoarios.



## **II. MALARIA**





## 1. Definición

La malaria, fiebre palúdica o paludismo, es una enfermedad infecciosa causada por el parásito protozoario del filo *Apicomplexa*, clase *Aconoidasida*, orden *Haemosporididae*, de la familia *Plasmodiidae*, del género *Plasmodium*<sup>5</sup>, y es transmitida por la hembra del mosquito del género *Anopheles*.

La malaria es la enfermedad tropical más importante del mundo, estando estrechamente ligada a la pobreza y causando la muerte de miles de personas al año.

El mayor problema en la lucha contra la enfermedad es la constante aparición de resistencias por el uso de monoterapias en tratamientos frente al parásito y de insecticidas utilizados frente al mosquito, además de la falsificación de algunos fármacos utilizados para su tratamiento en ciertos países.

## 2. Historia de la malaria

La malaria es una de las enfermedades más antiguas conocidas por la humanidad, teniéndose constancia de ella en manuscritos originarios de China, la India y el Antiguo Egipto.

El término malaria fue utilizado por los italianos (mal-aire), para describir la causa de fiebres intermitentes asociadas a la exposición al ambiente de las marismas o ciénagas, mientras que el término paludismo proviene del término latino “palus” que significa laguna o pantano.

Aunque su nombre tiene su origen en Europa, se cree que la malaria se extendió alrededor del globo desde el centro y oeste de África debido a migraciones, conquistas y viajes de hombres al Mediterráneo, Mesopotamia, la India y el sudeste asiático, siendo por tanto una enfermedad muy unida a la evolución del hombre.

Ya hace casi 5000 años que se tiene constancia de su conocimiento en China y 3500-4000 en Egipto. Se ha comprobado que *P. falciparum* alcanzó la India hace 3000 años y las orillas del Mediterráneo hace 2500-2000 años, llegando al norte de Europa hace unos 500-1000 años.<sup>6</sup>

Fueron los europeos y los esclavos africanos quienes introdujeron la enfermedad en el Nuevo Mundo en el siglo XV, aunque *P. vivax* y *P. malariae* fueron posiblemente introducidos desde el sudeste asiático por los primeros viajes a través del Pacífico.<sup>7</sup>

Alrededor del año 800 a.C. el sabio hindú Dhanvantari escribió que las picaduras de mosquitos podían causar enfermedades, fiebre y temblores. Fue quizás Hipócrates, alrededor del año 400 a.C. el primer malariólogo, describiendo las manifestaciones típicas de la malaria como la fiebre intermitente, frente a la fiebre continua de otras enfermedades infecciosas, la época del año donde aumentaban los casos y la localización de los enfermos, estableciéndose la relación enfermedad-agua estancada.

En 1696, Morton presentó la primera descripción detallada de los signos clínicos de la malaria, así como su tratamiento con cinchona. En 1716 Lancisi relacionó a la malaria con vapores venenosos de estanques de agua y comentó que era debida a la entrada en la sangre de diminutos gusanos, resurgiendo la vieja idea de que los mosquitos pudieran tener un papel en la enfermedad.<sup>8</sup> Fue Rasori quien sugirió en 1816 que el responsable de la enfermedad era un microorganismo y no “mal-aire”, aunque quien finalmente identificó al parásito de la malaria fue Laveran en 1880, siendo Marchiafava y Celli quienes observaron trofozoitos en los eritrocitos y lo llamaron *Plasmodium*.

En 1898, Grassi descubrió que el insecto *Anopheles claviger* era el vector que transmitía el parásito a humanos, y al año siguiente junto con Bignami y Bastianelli observó el ciclo completo de *P. falciparum*.<sup>9</sup>

Hubo que esperar hasta 1987 para desarrollar la primera vacuna sintética contra *P. falciparum* por parte de Patarroyo, y a 2002 para secuenciar el genoma de *Anopheles gambiae* y *Plasmodium falciparum*.

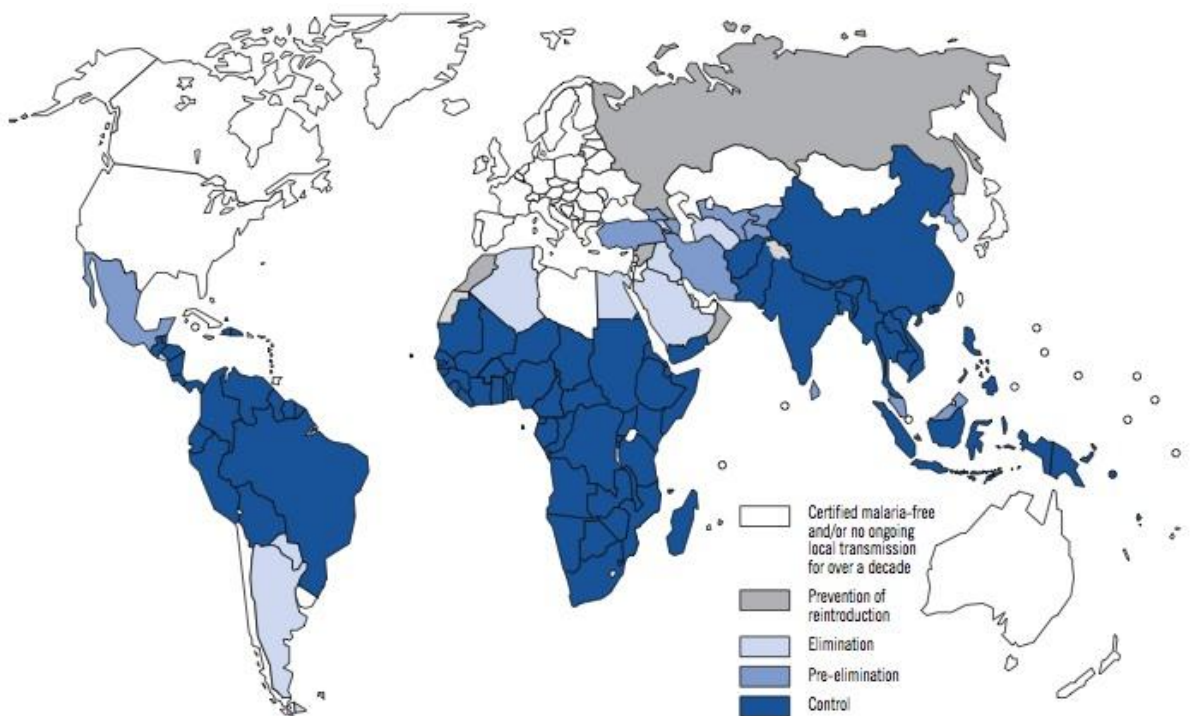
### **3. Epidemiología**

#### **3.1 Distribución e incidencia**

La malaria prevalece mayoritariamente en el África subsahariana, Sudamérica y algunas partes de Asia, es decir, las zonas tropicales y subtropicales del mundo (figura

1). Esto se debe a que el parásito interrumpe su desarrollo a una temperatura menor a 16 °C y el mosquito no pica a bajas temperaturas.<sup>10</sup>

Según el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la malaria es una enfermedad endémica en 106 países, estimando en 216 millones los casos registrados a nivel mundial que conllevaron la muerte de 266 mil personas en el año 2010, produciéndose un descenso del 25% en la tasa de mortalidad por malaria en la última década.<sup>11</sup>



**Figura 1.** Distribución mundial de la malaria: países libres, endémicos y en tratamiento.<sup>12</sup>

El 81% de los casos detectados provienen del África subsahariana, siendo el 86% de las víctimas a nivel mundial niños menores de 5 años, ya que junto a las mujeres embarazadas y a los fetos forman parte del grupo más vulnerable a la malaria.

De los 3300 millones de personas en riesgo de contraer la malaria, 2100 millones se encuentran en situación de alto riesgo, de los que el 47% pertenecen al continente africano y el 37% al asiático. De los 1200 millones restantes que están en bajo riesgo de contraer la enfermedad el 94% no son africanos. El 80% de los casos de malaria y el 90% de las muertes los produce la especie más agresiva del parásito: *P. falciparum*.

A pesar de ello, según la OMS muchos países de la región africana han disminuido en más del 50% los casos confirmados, ingresos y muertes en la última década debido a los cada vez más eficaces sistemas de vigilancia.

En el continente americano la malaria prevalece en la región amazónica y en Centroamérica, pero los casos son menores que en África y además el gasto destinado a su erradicación es mucho mayor, habiéndose producido un descenso del 55% en la última década. La mayoría de los casos en este continente son producidos por *P. vivax* aunque también los hay causados por *P. falciparum*.

Con respecto a Asia, el sudeste asiático es la zona donde la situación es más grave, prevaleciendo *P. falciparum* a diferencia del resto de Asia donde prevalece *P. vivax*. La disminución de las muertes supone un 42% de la disminución de la mortalidad por malaria en este continente.

En 1961 se registra el último caso de malaria autóctona en España y en 1964 es declarado país libre de malaria por la OMS. El continente europeo se considera libre de malaria desde hace unos años, aunque han aflorado casos recientemente debido a movimientos migratorios y al turismo, siendo su tasa de mortalidad solo del 1% de los casos.

### **3.2 Factores epidemiológicos e inmunidad**

Existen 2 tipos de factores de los que depende la epidemiología de esta enfermedad:

- Primarios:
  - Huésped o fuente de infección: portador.
  - Vector: hembras de ciertas especies del mosquito *Anopheles*.
  - Susceptibilidad humana: depende de factores de inmunidad natural o adquirida, factores genéticos, edad, migraciones, ocupación y características socioeconómicas.
- Secundarios: son los que ayudan a la transmisión de la enfermedad como los factores geográficos o climatológicos.

Pueden ser consideradas 3 tipos de inmunidad frente a la enfermedad:

- Natural: ciertos grados de población poseen algún grado de resistencia conferida por factores genéticos.
- Adquirida: ocurre en personas de exposición prolongada, aunque es un tipo de inmunidad parcial y relativa, ya que en muchos casos se pierde tras cambiar de hábitat.
- Pasiva: relacionada con la conferida por la madre al feto durante el embarazo en muchos lugares donde la enfermedad es endémica.

#### 4. El agente causante: *Plasmodium*

La malaria es causada por parásitos del género *Plasmodium* que se transmiten por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* infectados, llamados vectores del paludismo.

El *Plasmodium* es un protozoo eucariota unicelular esporozoario que se caracteriza por un estilo de vida intracelular obligado con orgánulos especializados en las diferentes funciones vitales. La proliferación se produce por invasión celular, crecimiento y división celular hasta que las réplicas destruyen la célula huésped. Además de ser el miembro más importante del filo *Apicomplexa*, se han encontrado hasta el momento 175 especies de *Plasmodium*, siendo capaces 5 de ellas de infectar a humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. Las 3 primeras son las que afectan en mayor grado al hombre, siendo *P. falciparum* el más violento y resistente. A pesar de que hasta hace poco se creía que *P. knowlesi* afectaba principalmente a los grandes simios, se han detectado infecciones en humanos en los últimos años, por lo que ha sido recientemente reconocida como la quinta especie con esta capacidad.<sup>13</sup>

El parásito es un protozoo con orgánulos especializados suspendidos en el citoplasma que se encargan de sus diferentes necesidades como el movimiento, la invasión celular, la penetración en membranas celulares, expulsión de enzimas, eliminación de metabolitos o nutrición por fagocitosis, siendo los trofozoítos las formas vegetativas móviles que constan de membrana, citoplasma y núcleo que contiene el ARN y ADN del parásito.

Una de las principales características del parásito es que no tiene sistema de locomoción (ni cilios ni flagelos), debiéndose su movilidad a un desplazamiento por deslizamiento.

Además, el complejo apical es uno de los orgánulos funcionales más característicos, involucrado en la interacción huésped-parásito durante la invasión celular y relacionado con la adherencia y perforación de la membrana eritrocítica durante la invasión celular, ya que excreta una sustancia que facilita la penetración celular. Esta penetración celular es imprescindible para el parásito ya que tiene dependencia total del huésped para su supervivencia.

## **5. El vector de transmisión: *Anopheles***

El parásito siempre tiene dos huéspedes en su ciclo de vida: el primero es el mosquito que actúa como vector y el segundo es un vertebrado.

El primer huésped del parásito y vector de transmisión es un mosquito hembra del género *Anopheles* (familia *Culicidae*). Hasta el momento se han encontrado 400 especies de *Anopheles* de las que 30-40 transmiten las especies del parásito del género *Plasmodium* que causa malaria en humanos en las regiones endémicas (figura 2). *Anopheles gambiae* es una de las especies mejor conocidas del mosquito debido a su importante papel en la transmisión de la especie más peligrosa del parásito (*P. falciparum*), siendo además el vector más numeroso en el África subsahariana y uno de los más eficientes del mundo.



**Figura 2.** Imagen de un mosquito del género *Anopheles*.<sup>14</sup>

Como todos los mosquitos, *Anopheles* atraviesa 4 estadios en su ciclo vital: huevo, larva, pupa e imago. Los 3 primeros ocurren en el agua y duran entre 5 y 14 días dependiendo de la especie y de la temperatura ambiente, siendo el estadio adulto cuando el mosquito *Anopheles* hembra actúa como vector del parásito, no teniendo una vida superior a 1-2 semanas.

## 6. Ciclo de vida de *Plasmodium*

Como se observa en la figura 3, el parásito presenta en su ciclo vital dos formas de reproducción: sexual que ocurre en el mosquito (fase esporogónica) y asexual que ocurre en el hombre.

Los mosquitos no son los que presentan el parásito inicialmente, sino que lo ingieren al picar a un ser humano infectado por medio de la sangre que contiene gametocitos. Los gametocitos macho fertilizan a los gametocitos hembra formando un cigoto que recibe el nombre de ooqueto, que penetra en la pared celular de los mosquitos para desarrollarse hasta formar un ooquiste y almacenarse en sus glándulas salivales. En este momento ya están listos para infectar a humanos, liberando esporozoítos al romperse el ooquiste, a través de la saliva durante la picadura. Esta fase esporogónica ocurre a gran velocidad y se completa en 2 semanas si las condiciones son las idóneas.

A partir de aquí la enfermedad se desarrolla en el hombre por medio de dos vías: exo-eritrocítica (hepática) y endo-eritrocítica. La primera comienza en el momento que el mosquito infectado pica al humano y transfiere en la saliva, además de los esporozoítos del parásito, otros compuestos anti-hemostáticos y vasodilatadores al torrente sanguíneo del humano. En 30 minutos, los esporozoítos llegan al hígado humano e infectan los hepatocitos, y durante un periodo de 6 a 15 días van a multiplicarse asexualmente (se llaman hipnozoítos durante este periodo de latencia de la enfermedad), para dar lugar a miles de merozoítos que rompen las células hepáticas e invaden al torrente sanguíneo.

En la vía endo-eritrocítica, los merozoítos una vez que se encuentran en el torrente sanguíneo invaden los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes) degradando la hemoglobina que contienen con el fin de utilizar como nutrientes aminoácidos

esenciales en el desarrollo de las nuevas formas del parásito, y convertirse en trofozoítos; estos a su vez maduran y se multiplican asexualmente para formar los esquizontes, que liberan de nuevo por lisis de glóbulos rojos merozoítos en su forma endo-eritrocítica que repetirán el ciclo de los hematíes. Es en el momento de la formación de los esquizontes cuando aparecen los síntomas clínicos, y a su vez, unos pocos merozoítos sufren gametogénesis dando lugar a gametocitos que infectarán nuevos mosquitos.

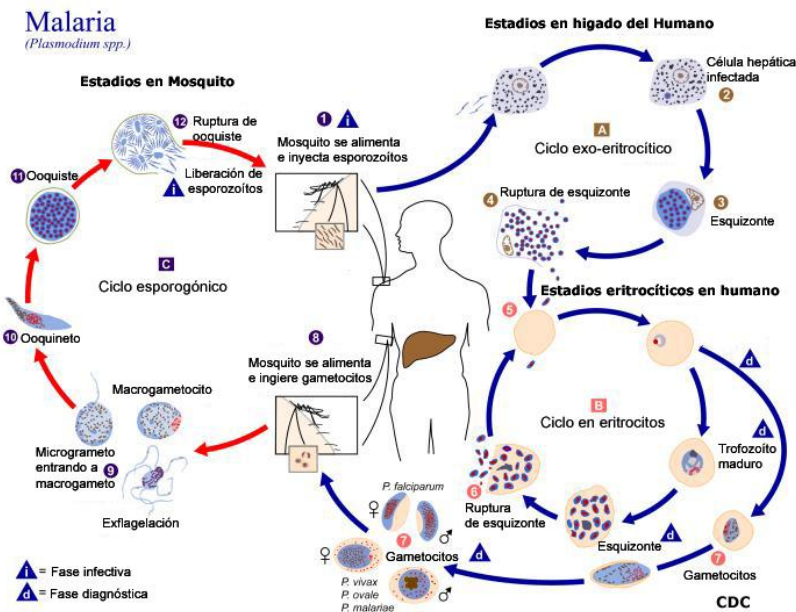


Figura 3. Ciclo biológico de *Plasmodium*.<sup>15</sup>

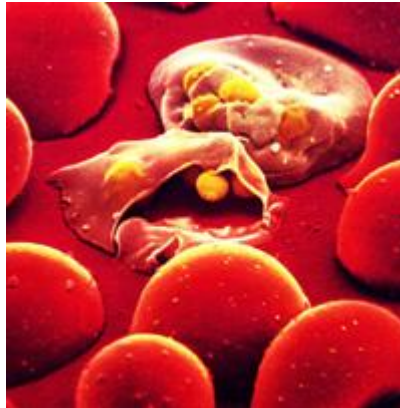
En general, la duración del ciclo eritrocítico en *P. vivax* y *P. falciparum* es de 48 horas, el de *P. ovale* 50 horas y el de *P. malariae* de 72 horas. En *P. vivax* y *P. ovale* algunos esporozoítos no se diferencian inmediatamente en merozoítos en fase exo-eritrocítica, sino que producen hipnozoítos que permanecen latentes de 6 meses a 3 años, reactivándose y produciendo merozoítos posteriormente.

## 7. Sintomatología

Como se ha descrito anteriormente, lo que causa la aparición de los síntomas clínicos en la infección por malaria es el desarrollo de los esquizontes y la posterior ruptura de los hematíes para seguir infectando hematíes sanos (figura 4). La liberación de ciertas sustancias junto con los merozoítos es otro factor que produce la



sintomatología característica: dolores musculares y debilidad, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, diarrea, tos, fiebre, sudoraciones y escalofríos.



**Figura 4.** Ruptura de eritrocitos infectados por *Plasmodium*.<sup>16</sup>

El comienzo de los síntomas en una infección por malaria son parecidos a los de un catarro o gripe común, y sus síntomas clásicos son la presencia cíclica de repentinos ataques de frío seguidos de fiebre alta y sudoración profusa durante 4-6 horas. La sintomatología observada en la infección por *Plasmodium* varía según el tipo de malaria que desarrolla el enfermo, como por ejemplo la periodicidad de los ciclos que coinciden con la multiplicación del parásito y la destrucción de hematíes.

En la malaria no complicada los síntomas característicos son acceso malárico, anemia<sup>a</sup>, esplenomegalia<sup>b</sup> y en ocasiones ictericia<sup>c</sup>. Los picos de fiebre se correlacionan con altos niveles séricos de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) por la liberación de proteínas del parásito en la ruptura de hematíes que crean la anemia, y asimismo, se crean anticuerpos contra los hematíes, diseritropoyesis<sup>d</sup> y secuestro esplénico<sup>e</sup>.

La malaria crónica produce esplenomegalia y hepatomegalia<sup>f</sup>, así como accesos febriles irregulares y de baja intensidad. La piel se vuelve amarillenta, se producen palpitations, somnolencia y fatiga, presentando una baja parasitemia. Se observa en enfermos infectados por *P. vivax* y *P. ovale*, pero no por *P. falciparum*.

Durante el embarazo la malaria produce una alta mortalidad materna por anemia, partos prematuros por insuficiencia cardíaca, palpitations, mareos y disnea<sup>g</sup>, repercutiendo en el feto provocándole la muerte o daños cerebrales.

La malaria severa es producida casi exclusivamente por *P. falciparum*, ocasionando disfunción de órganos vitales, fiebres altas persistentes, hipotensión

ortostática, fallo renal, alta parasitemia, imposibilidad de tratamiento vía oral y hemólisis intravascular. Si no es tratada puede progresar extremadamente rápido y ocasionar la muerte en días o incluso horas.<sup>17</sup>

La forma más grave de malaria severa es la malaria cerebral, causada exclusivamente por *P. falciparum*, siendo los niños el grupo más susceptible de contraerla. Los hematíes infectados se vuelven más adhesivos y se pegan a las paredes de los capilares produciendo anemia grave, fallo renal y pulmonar agudo, convulsiones, trastornos de movilidad, acidosis metabólica y síntomas neurológicos como encefalopatía reversible o pérdida de la conciencia que puede conllevar la muerte, debido al secuestro y bloqueo del flujo sanguíneo en los pequeños vasos del cerebro.<sup>18</sup>

---

<sup>a</sup> Patología general: empobrecimiento de la sangre por disminución de su cantidad total o cantidad de hemoglobina. <http://Dicciomed.eusal.es>

<sup>b</sup> Patología general: aumento de volumen o hipertrofia del bazo. <http://Dicciomed.eusal.es>

<sup>c</sup> Patología general: enfermedad producida por acumulación de pigmentos biliares en la sangre, cuya señal exterior más visible es la amarillez de la piel y las conjuntivas. <http://Dicciomed.eusal.es>

<sup>d</sup> Patología general: empobrecimiento de la sangre caracterizado por la disminución de uno, de varios o de todos sus elementos. <http://Dicciomed.eusal.es>

<sup>e</sup> Patología general: un gran número de células falciformes quedan atrapadas en el bazo y producen su agrandamiento repentino. Los síntomas pueden incluir debilidad repentina, palidez en los labios, respiración rápida, sed extrema, dolor abdominal (del estómago) o en el costado izquierdo del cuerpo y palpitaciones rápidas. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

<sup>f</sup> Patología digestiva y hepatológica: aumento de volumen o hipertrofia del hígado. <http://Dicciomed.eusal.es>

<sup>g</sup> Patología neumológica: dificultad para respirar. <http://Dicciomed.eusal.es>

## **8. Detección y diagnóstico**

El diagnóstico de la enfermedad es relativamente sencillo, siendo lo más importante, complicado y útil el diagnóstico concreto del tipo de malaria. Para ello el diagnóstico de la enfermedad se basa en una serie de criterios clínicos, epidemiológicos y de laboratorio, siendo las pruebas más concluyentes la visualización del parásito o la detección de antígenos en pruebas rápidas.

En el caso de los criterios clínicos se tendrán en cuenta episodios maláricos anteriores del paciente o una posible sintomatología reciente.

Con respecto a los criterios epidemiológicos, lo más importante es el estudio de los antecedentes como la exposición o relación con personas que hayan sufrido la enfermedad, antecedentes hospitalarios o transfusiones de sangre.

Dentro de los criterios de laboratorio, el diagnóstico rutinario y más sencillo de detectar la enfermedad es el método de la gota gruesa con tinción Giemsa, que se usa para la determinación de la parasitemia y tiene una sensibilidad de entre el 80% y el 100% de especificidad.<sup>19</sup> El método de frotis consiste en el examen microscópico de una capa fina de sangre siendo el método más económico, fiable y preferido en el diagnóstico de la malaria ya que se pueden distinguir las características diferenciales de las especies del parásito.

En zonas donde no haya microscopios o personal de laboratorio cualificado se pueden realizar test de detección de antígenos que solo requieren una gota de sangre (técnicas inmunocromatográficas) aunque pueden dar falsos negativos y no son métodos cuantitativos del grado de infección.<sup>20</sup>

Hay otras técnicas de detección más desarrolladas como las de biología molecular usadas en casos de baja parasitemia, infecciones mixtas o mutaciones, o como el sistema QBC (Quantitative Buffy Coat test) que es un método de screening para una detección rápida del parásito en sangre utilizando fluorescencia para su determinación, pero que requieren infraestructuras y personal cualificado.

Por tanto la forma más concluyente de diagnosticar que tipo de malaria afecta al enfermo será la combinación de estos criterios.

## 9. Medidas de control y prevención de la malaria

Existen dos tipos de estrategia para el control y prevención de la malaria: unas dirigidas al control del vector mosquito y otras al tratamiento y prevención del hospedador humano. Las medidas de prevención se centran en objetivos como prevenir la expansión de la enfermedad, proteger individuos en áreas donde la malaria es endémica, erradicación del mosquito, prevención de la picadura del mosquito y el desarrollo de medicamentos profilácticos.

En lo que a la lucha antivectorial se refiere, se ha comprobado que el uso de insecticidas como el DDT (diclorodifeniltricloroetano) o repelentes de mosquitos como el DEET (*N,N*-dietil-meta-toluamida) han sido efectivos en la reducción de la incidencia y mortalidad de la malaria. El problema con algunos insecticidas como el DDT, es que debido a su persistencia en los tejidos animales y en plantas, han sido prohibidos y su uso descontrolado ha dado lugar a la aparición de resistencias en mosquitos de algunas regiones.<sup>21</sup> A pesar de ello, el DDT se sigue utilizando en algunas zonas y puede llegar a ser eficaz de 9 a 12 meses.

Otro método de lucha contra el vector es el uso de mosquiteras en las camas, siendo una medida que ha dado buenos resultados en la reducción de infecciones y transmisiones de la enfermedad, disminuyendo a la mitad en los casos en que las mosquiteras eran impregnadas con insecticida cada 6 meses. La reducción tan drástica en el número de infecciones y transmisiones con estos métodos se debe a que el mosquito *Anopheles* se alimenta por las noches. El problema de este método radica en que el coste de estas mosquiteras son inasumibles por parte de las personas que se ven amenazadas por la enfermedad, ya que la mayor parte vive en países del Tercer Mundo.

Con respecto al factor humano, algunos medicamentos utilizados para el tratamiento de la enfermedad pueden ser tomados de manera preventiva en bajas dosis diaria o semanalmente. El uso de estos medicamentos profilácticos rara vez se utiliza en personas que viven en zonas donde la enfermedad es endémica, sino que más bien son utilizados por visitantes y viajeros que están un corto periodo de tiempo en estas zonas.<sup>22</sup> Durante el siglo XVII se utilizó como medicamento profiláctico la quinina y fue progresivamente sustituida por quinacrina, cloroquina y primaquina. Actualmente los medicamentos usados en la prevención de la enfermedad son la mefloquina, la doxiciclina y la combinación de proguanil y atovaquona, dependiendo su elección del

tipo de parásito que presente resistencia en esa área.<sup>23</sup> No obstante, los medicamentos profilácticos no tienen efecto inmediato y deben ser administrados varias semanas antes de la posible exposición a la enfermedad y dejar de ser administrados varias semanas después. Además, ningún medicamento profiláctico garantiza total protección frente al desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, la producción de una vacuna efectiva constituiría una poderosa herramienta en la prevención y control de la enfermedad. Desafortunadamente y a pesar de los considerables esfuerzos en su investigación, no se ha conseguido desarrollar ninguna vacuna completamente efectiva. En la actualidad la mayoría de estrategias para el desarrollo de vacunas y tratamientos se centran en el campo de la genómica.

## 10. Tratamiento

### 10.1 *Historia del tratamiento*

La primera tentativa de un tratamiento específico contra la malaria se remonta a principios del siglo XVIII y consistía en usar corteza de árboles del género *Cinchona* que ya se utilizaban a principios del siglo XVII en el tratamiento de la fiebre.

En 1820 se consiguió aislar el principio activo de la quinina y fue sustituyendo progresivamente a la corteza de *Cinchona*, siendo la malaria una de las primeras enfermedades en ser tratadas con un compuesto químico puro.<sup>24</sup>

En 1891 Paul Ehrlich curó a dos pacientes que padecían malaria utilizando el azul de metileno que se usaba en la visualización microscópica de algunas especies de parásitos como tinción. Ésta fue la primera vez que un fármaco sintético fue utilizado para el tratamiento de humanos.<sup>25</sup>

En 1925 modificando la estructura del azul de metileno fue sintetizada la pamaquina también llamada plasmocina, siendo el primer fármaco capaz de prevenir recaídas en malaria causada por *P. vivax*.

En 1932 se desarrolló la mepacrina que era un derivado de acridina también conocida como atebrina o quinacrina que se mostró activa frente a diferentes estadios de *P. falciparum* en sangre.

Dos años después la cloroquina ya había sido sintetizada aunque no se utilizó hasta el año 1946 ya que se consideraba muy tóxica. Desde entonces, la cloroquina se ha convertido en el antimalárico más importante utilizado y efectivo, llegando a ser el fármaco elegido en varios programas dirigidos a la erradicación global de la malaria, a pesar de que a finales de los años 50 del siglo pasado aparecieron los primeros casos de resistencia al fármaco.

Durante la Segunda Guerra Mundial, se desarrolló el proguanil que sirvió como compuesto líder en el desarrollo de pirimetamina en 1950.

En el año 1969 durante la Guerra de Vietnam se desarrollaron la mefloquina y la halofantrina, que son aminoalcoholes derivados de la quinina.

No obstante, existe un grupo de fármacos completamente diferentes derivados de la medicina tradicional china procedentes de una planta llamada *Artemisina Annuua*, que ya se utilizaba en el tratamiento de hemorroides en la Antigua China y que desde el año 1596 se utilizaba en el tratamiento de fiebres. Fue en el año 1972 cuando se consiguió aislar e identificar el compuesto activo de la artemisina mostrando potencial actividad antimalárica, siendo utilizados sus derivados en la actualidad en la administración rutinaria para el tratamiento de la enfermedad, sobre todo en Sudamérica, con resultados eficaces y con baja toxicidad.

## **10.2 Clasificación de los compuestos antimaláricos**

Los compuestos antimaláricos pueden ser clasificados según:

- La actividad antimalárica, pudiendo actuar en el humano o en el mosquito. En el caso del hombre se encuentran los que actúan en estados pre-eritrocíticos, los que actúan como hipnotizidas en los casos de *P. vivax* y *P. ovale* (a nivel hepático) o los que actúan como esquizonticidas en sangre. En el mosquito, se clasifican los que actúan como gametocidas y los que actúan como esporonticidas, previniendo ambos la transmisión.
- Su mecanismo de acción, encontrando compuestos que actúan sobre la vacuola digestiva de *Plasmodium* (responsable de la degradación de la hemoglobina y detoxificación de la hematina), sobre enzimas involucradas en la síntesis y metabolismo de macromoléculas incluyendo la síntesis de purinas y pirimidinas,

sobre procesos de membrana, y sobre la glucólisis y síntesis de ATP mitocondrial.

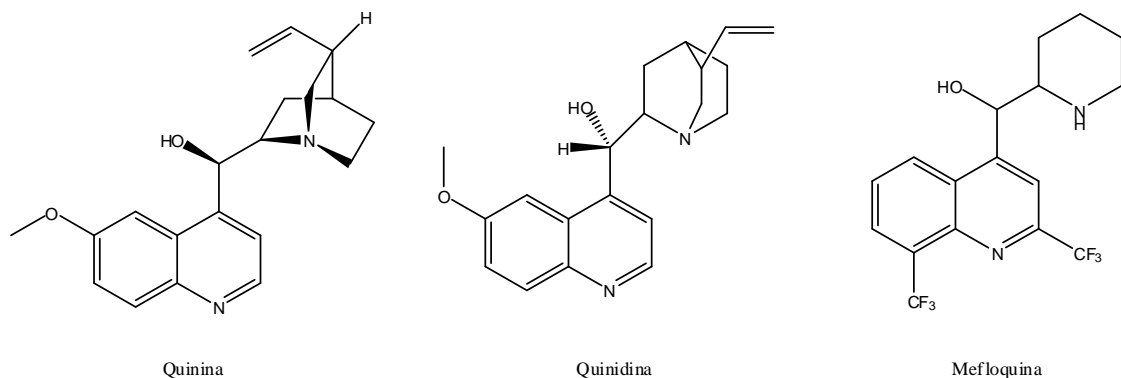
- La estructura química, encontrándose familias de compuestos con actividades diferentes en múltiples áreas y niveles, como:

• **Metanolquinolinas y arilaminoalcoholes**

Esta familia de compuestos tiene gran importancia, englobando a estructuras de gran relevancia histórica como la quinina o la lumefantrina que se usa actualmente en terapias combinadas.

Estas dos familias de compuestos están relacionadas entre sí y destacan por su gran efectividad como esquizotocidas sanguíneos, interviniendo en la digestión de la hemoglobina.

Pertencientes a la familia de las metanolquinolinas destacan la **quinina** y la **quinidina** (que son estereoisómeros L y D, respectivamente), y la **mefloquina** (figura 5).

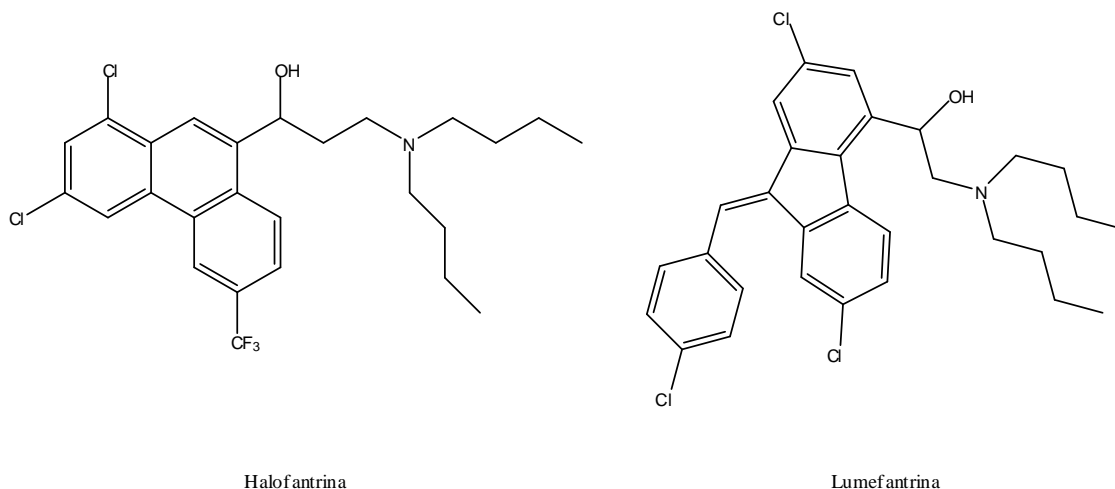


**Figura 5.** Estructura de metanolquinolinas.

La quinina y la quinidina a pesar de presentar efectos adversos siguen siendo muy utilizados debido a su fácil acceso, mientras que la mefloquina es muy útil en malarías resistentes aunque tiene efectos neuro-psiquiátricos adversos. De todas formas, su uso ha declinado desde el desarrollo de las aminoquinolinas y de la artemisina y sus derivados.

Los arilaminoalcoholes son estructuralmente derivados de la quinina, y al igual que las metanolquinolinas son estructuras con gran capacidad esquizotocida que

intervienen en la degradación de la hemoglobina, como es el caso de la **halofantrina** y la **lumefantrina** (figura 6).



**Figura 6.** Estructura de arilaminoalcoholes.

Tanto la halofantrina como la lumefantrina, que es un análogo de la primera, se desarrollaron tras la aparición de resistencias a la quinina y a la cloroquina, y aunque se ha comprobado que la halofantrina es altamente efectiva su administración ha sido severamente restringida debido a su potencial inducción de arritmias cardiacas.<sup>26</sup>

#### • **Aminoquinolinas**

En este grupo de compuestos se distinguen dos familias con mecanismos de acción muy distintos que afectan a diferentes estadios del ciclo de vida del parásito: las 4-aminoquinolinas y las 8-aminoquinolinas.

Por un lado las 4-aminoquinolinas actúan en las fases endo-eritrocíticas del parásito, teniendo esta familia grandes ventajas por ser fáciles de sintetizar, ser económicos, ser bien tolerados y ser además la clase de compuestos más exitosos para el tratamiento y la profilaxis de la enfermedad. Esta familia engloba a compuestos tan importantes como la **cloroquina (CQ)**, efectiva en profilaxis pero que en la actualidad presenta problemas de resistencias, o la **amodiaquina**, que a pesar de ser hepatotóxica es mejor que la CQ para eliminar parasitemias en casos de malaria no complicada e incluso en cepas cloroquina resistentes (figura 7).

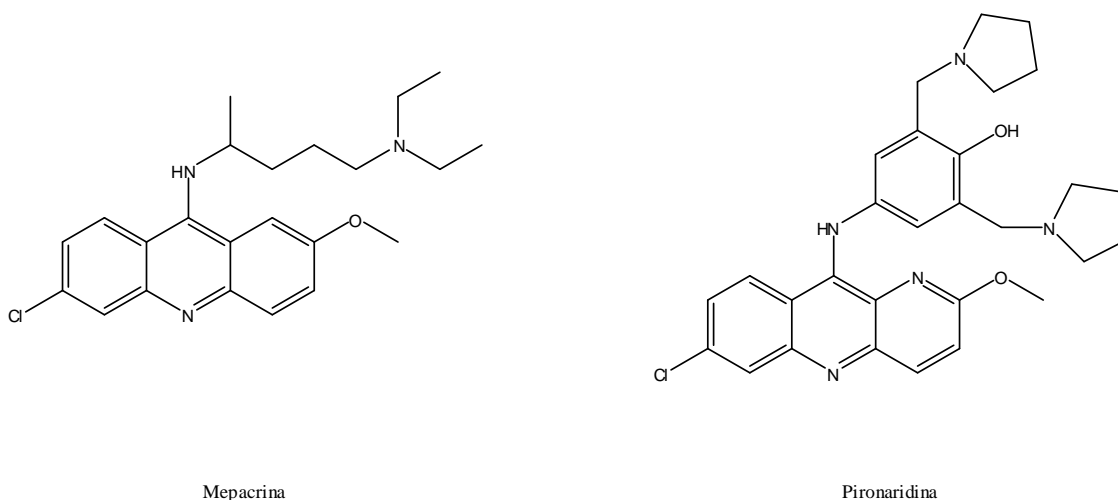




• **Derivados de acridina**

Los compuestos derivados de acridina han tenido un papel importante en la historia y desarrollo de antimaláricos. La **mepacrina**, que posee una cadena lateral idéntica a la cloroquina, fue el primer antimalárico sintético esquizonticida usado clínicamente, pero su uso declinó con el auge de la cloroquina. Cuando aparecieron las resistencias a CQ y otros compuestos alternativos, se renovó el interés por su actividad antimalárica.

La **pironaridina** que también pertenece a esta familia, es un compuesto ampliamente utilizado en China y que se usa en el tratamiento frente a *P. falciparum* multirresistente. El problema en este caso se debe tanto a la baja biodisponibilidad oral como a su elevado coste (figura 9).

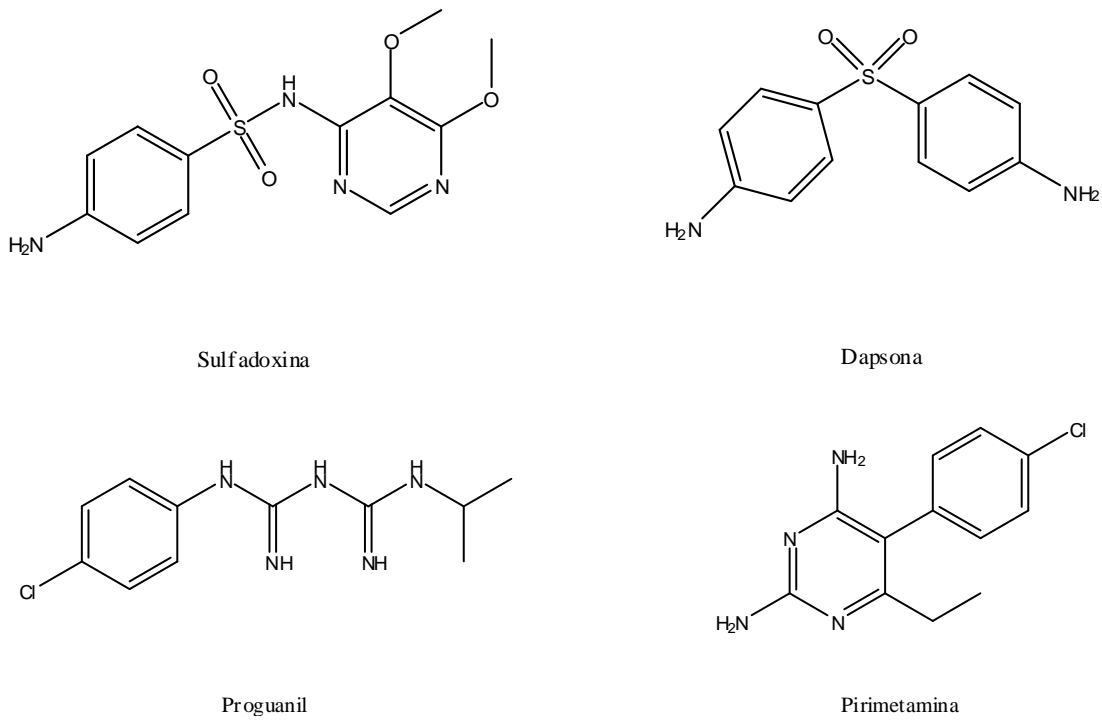


**Figura 9.** Estructura de derivados de acridina.

• **Antifolatos e inhibidores de la síntesis de folatos**

Tanto el ser humano como el parásito metabolizan el ácido fólico en ácido tetrahydrofólico necesario para su supervivencia, la diferencia radica en que el hombre obtiene el necesario a través de la dieta, mientras que el parásito no puede obtener ácido fólico exógeno para su metabolización. Los antifolatos inhiben el metabolismo del ácido fólico actuando como coenzimas de la síntesis de ADN y pirimidina. Estos compuestos actúan inhibiendo los primeros estadios de crecimiento del parásito en el hígado y deteniendo la reinfección del

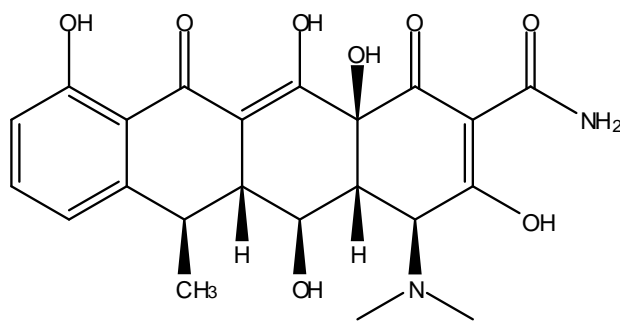
mosquito. Se distinguen en este grupo de compuestos los inhibidores competitivos de dihidropteroato como la **sulfadoxina** y la **dapsona**, y los inhibidores de dihidrofolato reductasa como el **proguanil** y la **pirimetamina** (figura 10).



**Figura 10.** Estructura de antifolatos.

• **Antibióticos**

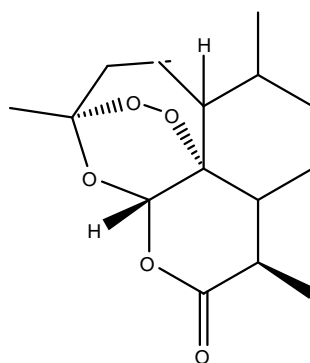
Estos compuestos actúan a nivel celular y del genoma, siendo una de sus dianas la inhibición de la síntesis de proteínas con funciones metabólicas que el parásito requiere para su supervivencia. Destacan los antibióticos del grupo de las tetraciclinas, y en especial la **doxiciclina** que es la más utilizada de esta familia tanto en el tratamiento como en la profilaxis y en la combinación con otros compuestos en casos de resistencias (figura 11).



**Figura 11.** Estructura de la doxiciclina.

### • *Artemisinas y terapias combinadas de artemisinas*

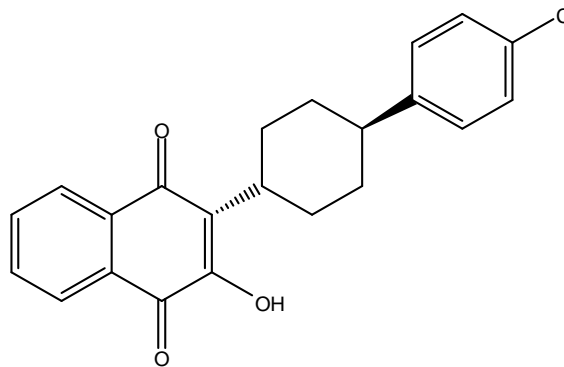
Esta familia proviene del compuesto aislado de la planta *Artemisia Annu*, obteniéndose la **artemisina** por vía natural mientras que sus derivados son semisintéticos (figura 12). El mecanismo de acción es el mismo que el de las 4-aminoquinolinas aunque vía radicales libres y son muy activos frente a malaria con actividad aguda, aunque por otro lado presentan un tiempo de vida muy corto que les impide eliminar toda la parasitemia, siendo necesarias terapias combinadas con otros compuestos. Se han descrito evidencias clínicas que concluyen que existen en la actualidad casos de resistencias a la artemisina y a los TCA promovida principalmente por el extendido uso de la monoterapias de artemisina pero todavía está en estudio el mecanismo por el que se producen.<sup>11</sup>



**Figura 12.** Estructura de la artemisina.

• **Otros compuestos: atovaquona y agentes quelantes de hierro**

La **atovaquona** es un derivado de la hidroxinaftoquinona y un análogo de la ubiquinona. Se trata de un compuesto activo frente a todas las especies de *Plasmodium* inhibiendo el desarrollo pre-eritrocítico en el hígado y del ooquiste en el mosquito, aunque se descubrió que presentaba sinergia con el proguanil y que producía la aparición de resistencias muy rápidamente, por lo que no debe ser administrado como monoterapia (figura 13).<sup>28</sup>



**Figura 13.** Estructura de la atovaquona.

Con respecto a los agentes quelantes de hierro, captan el hierro que es esencial para el crecimiento, multiplicación y síntesis de ADN por parte del parásito. Destaca la **desferrioxamina** que es un quelante muy fuerte de  $\text{Fe}^{+3}$  y que resulta muy tóxico para el parásito.<sup>29</sup>

## 11. Resistencia a terapias actuales

Según la OMS, resistencia es la capacidad de una cepa parasitaria de sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de un medicamento dada a dosis iguales o mayores que aquellas usualmente recomendadas aunque dentro de los límites de tolerancia del sujeto.

Una de las mayores desventajas en el tratamiento frente a la malaria es el rápido desarrollo y expansión de resistencia a *P. falciparum* y *P. vivax* frente a la mayoría de compuestos antimaláricos. Ésta es la razón por la que las investigaciones van dirigidas al desarrollo de nuevos antimaláricos con dianas específicas en el parásito y el nuevo uso de compuestos más antiguos como la quinina, ya que a pesar de sus efectos

adversos es muy accesible en los países pobres. Recientemente se han conseguido conocer algunas de las resistencias gracias al estudio del genoma y de los mecanismos de acción de los diferentes tratamientos, siendo responsables de algunas de ellas el extendido uso de monoterapias, como es el caso de la artemisina, y la falsificación en algunos países de algunos fármacos.

## **12. Tratamientos actuales**

Los regímenes terapéuticos en malaria son muy diversos ya que dependen de varios factores como las características del paciente, el tipo de *Plasmodium* que infecta y la zona donde se contrae la enfermedad.

### *- Cloroquina*

Se usa a dosis máxima de 25 mg/kg vía oral en *P. ovale* y *P. malariae* además de en cepas sensibles de *P. vivax* y *P. falciparum*. Su alternativa terapéutica es gluconato de quinidina o quinina. Sus efectos adversos son náuseas, irritación con picor o desórdenes neuropsiquiátricos. La sobredosis se trata con diazepam. En el caso de cepas de *P. vivax* resistentes se usa mefloquina, halofantrina o sulfato de quinina combinado con tetraciclinas o sulfonamidas. Para tratar recaídas por hipnozoítos se usa el fosfato de primaquina y en el caso de *P. falciparum* resistente el sulfato de quinina 250 mg/kg combinado con pirimetamina/sulfadoxina o doxiciclina. Para tratar a mujeres embarazadas y a niños se combina la quinina con clindamicina.

### *- Quinina*

Utilizada para el tratamiento de *P. falciparum* resistente a CQ, actuando como esquizonticida sanguíneo. Como alternativa se usa el gluconato de quinidina que es más potente. Las alternativas terapéuticas son mefloquina, halofantrina, atovaquona, artemisina y pirimetamina/sulfadoxina. En el caso de *P. falciparum* se emplea artemisina IV combinada con tetraciclina o mefloquina.. Los efectos adversos son su sabor, tinnitus y pérdida de audición reversible.

- *Pirimetamina/sulfadoxina (Fansidar®)*

Es inhibidor de la síntesis de ácido fólico del ciclo vital del parásito que se utiliza mucho en países en vías de desarrollo debido a su bajo coste, aunque el desarrollo de resistencia a los antifolatos lo ha colocado como agente de segunda línea.

- *Mefloquina (Lariam®)*

Puede administrarse a dosis única de 25 mg/kg, actuando como esquizotónica sanguínea. Puede combinarse con doxiciclina, quinina y derivados de artemisina pero no se debe administrar a niños de menos de 15 kg ni a pacientes que reciban profilaxis o halofantrina. Sus efectos adversos consisten en vómitos, mareos, delirio, ataxia y convulsiones, debido a su toxicidad neurológica.

- *Halofantrina*

Se administra en dosis de 24 mg/kg interviniendo en la degradación de la hemoglobina. Su absorción oral es variable y está contraindicado en enfermos con afecciones cardíacas, embarazadas y durante la lactancia, estando asociada a arritmias y toxicidad cardíaca.

- *Atovaquona/proguanil (Malarone®)*

La dosis empleada es 250 mg atovaquona/100 mg proguanil, usándose generalmente en la profilaxis aunque también con *P. falciparum* resistente a otros medicamentos. Tiene la gran ventaja de no presentar efectos adversos destacables.

- *Derivados de artemisina y TCA*

La dosis empleada es de 12 mg/kg aunque es conveniente que se combinen con mefloquina, tetraciclina o clindamicina, siendo el tratamiento de elección para *P. falciparum* resistente a quinina. La ventaja radica en la rápida eliminación de parasitemia y aunque no se ha descrito toxicidad severa en humanos, no se ha determinado la seguridad de su uso durante el embarazo.

- *Artemeter/lumefantrina (Coartem® y Riamet®)*

Consiste en una combinación fija de 20 mg de artemeter y 120 mg de lumefantrina, con acción esquizonticida sanguínea y siendo eficaz contra cepas de *P. falciparum* resistentes a tratamientos sin artemisina.

### **13. Nuevas estrategias en la prevención y tratamiento de la malaria**

Actualmente la estrategia mundial contra la malaria tiene cuatro elementos básicos:

- Asegurar el diagnóstico precoz y el tratamiento inmediato.
- Planificar y aplicar las medidas selectivas y sostenibles de prevención.
- Detectar a tiempo, contener o prevenir las epidemias.
- Reforzar la capacidad local en materia de investigación básica y aplicada para evaluar regularmente la situación del paludismo en esa región.

#### **13.1 *Búsqueda de nuevas dianas***

Se han desarrollado nuevas líneas de investigación debido a la necesidad de búsqueda de nuevos medicamentos por la aparición de resistencias por las mutaciones del ADN del parásito. Esto se está llevando a cabo gracias a los avances en el mundo de la Química y de las nuevas tecnologías, así como al desarrollo de la Bioquímica y de la Genómica que posibilitan la determinación de nuevas dianas.

Destacan actualmente diferentes proyectos que se encuentran en la fase de identificación de cabezas de serie con actividad antimalárica o en periodo de optimización con el fin de generar compuestos con propiedades terapéuticas adecuadas, como los inhibidores de proteasas, de síntesis de ácidos grasos, de síntesis de isoprenoides o del transporte y metabolismo de fosfolípidos, y del metabolismo mitocondrial o pirimidínico.

#### **13.2 *Productos naturales***

A lo largo de la historia del tratamiento de la malaria los productos naturales han tenido gran importancia como es el caso de la artemisina. La sociedad apuesta cada vez



más por lo natural y se han planteado búsquedas de compuestos activos en plantas no solo de diferentes regiones terrestres, sino también del mundo marino. Éste es el caso de algunos compuestos provenientes de ciertas especies de esponjas, algas y corales que han demostrado poseer actividad antimalárica como las pirroloquinolinas o las manzaminas A.<sup>30</sup>

### **13.3      *Desarrollo de vacunas***

Las vacunas experimentales están basadas en diversos antígenos derivados de las diferentes formas que adopta el parásito durante su ciclo de desarrollo.

Actualmente los tipos de vacunas que se están desarrollando se clasifican en:

- Vacunas pre-eritrocíticas: son aquellas que impiden que los esporozoítos penetren o se desarrollen en las células hepáticas.
- Vacunas contra las formas hemáticas asexuadas: son aquellas que impiden que los merozoítos penetren o se desarrollen en el interior de los hematíes.
- Vacunas bloqueadoras de la transmisión: son aquellas que estimulan la producción de anticuerpos contra antígenos de la fase sexuada del parásito, que puedan impedir el desarrollo de esporozoítos infecciosos en las glándulas salivales del mosquito *Anopheles*.

A pesar de las prometedoras vacunas que están en desarrollo actualmente, hay que tener en cuenta que los parásitos desarrollan ingeniosos y complejos mecanismos para soslayar la respuesta inmunitaria del huésped.



### **III. LEISHMANIASIS**



## 14. Definición

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por el parásito protozoario del filo *Euglenozoa*, clase *Trypanosomatidea*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* del género *Leishmania* y es transmitida por la picadura de insectos dípteros de la familia *Psychodidae*, géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*.<sup>31</sup>

Al igual que la malaria, la leishmaniasis está relacionada con climas tropicales y subtropicales, y con países pobres o en vías de desarrollo. La enfermedad por su naturaleza zoonótica afecta tanto a perros como a humanos, sin embargo, animales silvestres como zarigüeyas, coatíes y osos hormigueros entre otros, son portadores asintomáticos del parásito, siendo considerados como animales reservorios.

Dependiendo del tipo de leishmaniasis el tratamiento de la enfermedad puede ir desde la ausencia de éste hasta ser extremadamente difícil de tratar. Recientemente se ha informado de la aparición de resistencias a los fármacos, requiriendo el uso de nuevos fármacos más tóxicos. Esto unido a que la mayoría de los fármacos son de elevado coste, que requieren regímenes de tratamiento largos y que son cada vez menos efectivos frente al parásito, hace necesario el descubrimiento de nuevos compuestos.

## 15. Historia de la leishmaniasis

Los orígenes de la enfermedad no son claros, abarca posibles migraciones desde su posible origen en el continente africano o paleártico hacia el continente americano a través del estrecho de Bering hace millones de años, incluyendo los vectores de la enfermedad que se adaptarían a los nuevos hábitats. Una migración más reciente es la de la especie *L. infantum* desde el Mediterráneo a los países latinoamericanos debido a la colonización europea del Nuevo Mundo.<sup>32,33</sup>

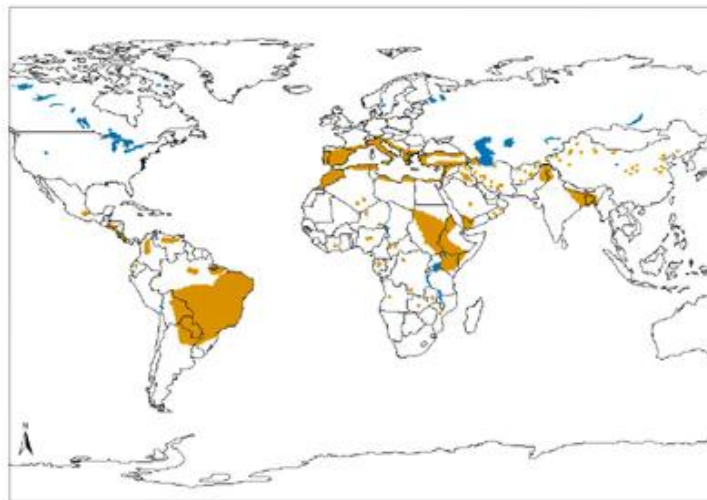
Aunque la primera descripción de la enfermedad tuvo lugar alrededor del año 1500 por El-Razy de Iraq, no fue hasta 1898 cuando Peter Borovsky descubrió el agente etiológico responsable de la enfermedad y describió de forma correcta el agente causante de la leishmaniasis cutánea.

En 1901 fue W. B. Leishman quien observó cuerpos ovals durante el examen de muestras patológicas de bazo de un paciente que había muerto por la enfermedad.

## 16. Epidemiología: distribución e incidencia

Según el informe de la OMS, actualmente la leishmaniasis se extiende a lo largo de cuatro continentes, siendo endémica en 88 países, 72 de los cuales están en vías de desarrollo. Es una enfermedad íntimamente ligada a la pobreza y sus diferentes formas se distribuyen de la siguiente manera:

- El 90% de los casos mundiales de *leishmaniasis visceral* tienen lugar en: Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán (figura 14).



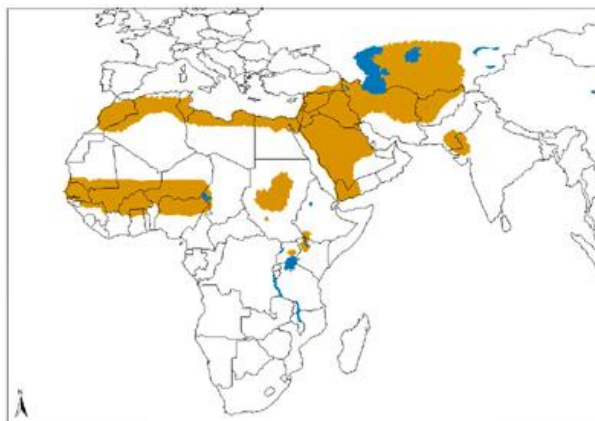
**Figura 14.** Distribución mundial de leishmaniasis visceral.<sup>34</sup>

- El 90% de los casos de *leishmaniasis mucocutánea* en el mundo ocurren en: Bolivia, Brasil y Perú (figura 15).



**Figura 15.** Distribución de leishmaniasis mucocutánea en el Nuevo Mundo.<sup>34</sup>

- El 90% de los casos de *leishmaniasis cutánea* en el mundo ocurren en: Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria (figura 16).



**Figura 16.** Distribución de leishmaniasis cutánea debida a *L. major* en el Viejo Mundo.<sup>34</sup>

La leishmaniasis afecta a personas muy pobres asociadas a malnutrición, migraciones, analfabetismo, viviendas insalubres, discriminación, debilidad del sistema inmunológico y falta de recursos.

A pesar de que hasta hace poco tiempo la leishmaniasis era un problema de salud terriblemente subestimado, esta enfermedad ha llegado a ser un serio impedimento para el desarrollo socioeconómico de los países afectados.

Durante los últimos diez años los casos han aumentado y las zonas endémicas se han extendido con el agravante de que no todos los casos son registrados, ya que solo 32

de los 88 países endémicos realizan un seguimiento obligatorio de los afectados por esta enfermedad. Se estima en 2 millones los nuevos afectados por la enfermedad en el mundo cada año, de los que 1,5 millones padecen leishmaniasis cutánea y 500 mil leishmaniasis visceral, formando un total de 12 millones de personas afectadas.

Al igual que muchas enfermedades ligadas a la pobreza, causa alta morbilidad pero baja mortalidad, con una presencia altamente invisible, ya que la mayoría de afectados vive en lugares remotos padeciendo estigmas sociales debido a las deformidades y cicatrices fruto de la enfermedad.<sup>35</sup>

## 17. El agente causante: *Leishmania*

La leishmaniasis es causada por parásitos del género *Leishmania* que se transmiten por la picadura de mosquitos hembra de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* infectados (tabla 1).

*Leishmania* es un protozoo flagelado cuya morfología y ciclo vital de las distintas especies que afectan al ser humano son similares pero cuyas manifestaciones clínicas pueden ser diferentes.

**Tabla 1.** Especies de *Leishmania* que infectan a humanos.

<b>Especies del Viejo Mundo</b>	<b>Especies del Nuevo Mundo</b>	<b>Tipo de enfermedad</b>
<b>Complejo <i>L. major</i></b> <i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i>	<b>Complejo <i>L. mexicana</i></b> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) pifanoi</i> <i>L. (L.) venezuelensis</i> <b>Subgénero <i>L. (Viannia)</i></b> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (V.) lansonii</i>	<b>Cutánea</b>
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<b>Mucocutánea</b>
<i>L. (L.) aethiopica</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) pifanoi</i>	<b>Cutánea difusa o diseminada</b>
<b>Complejo <i>L. donovani</i></b> <i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) chagasi</i>	<b>Visceral</b>



Debido a que posee dos formas durante su desarrollo, *Leishmania* es considerado un parásito protozoo dimórfico que posee un ciclo de vida complejo. Cada una de estas formas representa una adaptación a las condiciones ambientales que el parásito encuentra cada vez que se ubica en uno de sus dos hospedadores: el mamífero y el insecto vector.

En el intestino del mosquito vector, *Leishmania* se replica extracelularmente con una forma característicamente flagelada denominada promastigote, cuando estos promastigotes son transferidos al mamífero, se transforman, una vez están en el interior de la vacuola parasitófora de la célula fagocítica, en una forma sin flagelo denominada amastigote.<sup>36</sup>

Cada una de estas formas de desarrollo del parásito se diferencia por los requerimientos de nutrientes, su tasa de crecimiento, la expresión regulada de moléculas de superficie y su morfología. Los promastigotes son células alargadas con un cuerpo celular que mide 5-20 x 1-4  $\mu\text{m}$  y un flagelo anterior de 20  $\mu\text{m}$  de longitud, mientras que los amastigotes son células redondas que miden 2 x 4  $\mu\text{m}$ .

La diferenciación de *Leishmania* está marcada por cambios en la morfología y función de los orgánulos en las vías secretora y endocítica. La endocitosis y exocitosis tienen lugar en el reservorio del bolsillo flagelar de ambas formas del parásito, utilizando los transportadores de membrana y la fusión de vacuolas autofágicas para adquirir moléculas desde el exterior celular. Los ácidocalcisomas sirven como lugar de almacenamiento y liberación de grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  importantes para la señalización celular.

A nivel energético, el parásito depende de la glicólisis y la fosforilación oxidativa para la obtención de energía, siendo el glicosoma el único orgánulo relacionado con la generación de ATP por la vía glicolítica. Al igual que otros miembros de la familia *Trypanosomatidae* tiene una sola mitocondria que se extiende a lo largo de todo su cuerpo, en cuyo interior cerca del cuerpo basal del flagelo, se encuentra una estructura denominada kinetoplasto el cual posee cerca del 15% del total del ADN celular.

El núcleo, tanto en promastigotes como en amastigotes, se encuentra rodeado por retículo endoplasmático, y en el centro se observa un prominente nucléolo de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro.<sup>37</sup>

## 18. Vectores de transmisión: *Phlebotomus* y *Lutzomyia*

El parásito siempre tiene 2 huéspedes en su ciclo de vida: el primero es el mosquito que actúa como vector y el segundo es un vertebrado.

El primer huésped del parásito y vector de transmisión es un mosquito díptero hembra del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, ambos pertenecientes a la familia *Psychodidae*, habiéndose encontrado hasta el momento 20 especies que transmiten el parásito.

Estos mosquitos destacan por tener un tórax arqueado, con cuerpo, alas y patas densamente pilosas (figura 17). No son insectos adaptados al hábitat de las ciudades y su transmisión por medio de las hembras exclusivamente se debe a que éstas son hematófagas, requiriendo sangre para la maduración de los huevos.



**Figura 17.** Imagen de un mosquito del género *Phlebotomus*.<sup>38</sup>

De los huevos salen las larvas las cuales después de 4 mudas alcanzan el estadio de pupa que da lugar al imago. La duración total del ciclo oscila entre 30-85 días, dependiendo principalmente de factores ambientales como la temperatura y humedad relativa.

La actividad es crepuscular y post-crepuscular, pero en sitios sombreados y húmedos puede tener actividad diurna, abundando durante los meses calurosos y lluviosos.

Son insectos muy pequeños, generalmente miden de 1,5 a 3 mm de largo con coloración general gris amarillenta y ojos muy oscuros que destacan sobre la cabeza.<sup>39</sup>

## **19. Ciclo de vida de *Leishmania***

El ciclo típico de vida de *Leishmania* se inicia cuando una hembra del mosquito vector se alimenta de la sangre de un mamífero hospedador infectado (figura 18). El parásito, que está en su forma amastigote, se encuentra en ese momento en el interior de la vacuola fagocítica de macrófagos de la piel y otras células fagocíticas, siendo transportado al interior del mosquito. Una vez dentro del intestino del mosquito y debido al cambio de temperatura y aumento de pH, se inicia la transformación del amastigote hacia un parásito flagelado que posee una pobre motilidad. Esta primera fase del parásito en el vector, caracterizada por una elevada replicación, es llamada “promastigote procíclico”. Aquí el parásito se encuentra ubicado en la parte posterior del intestino del mosquito y da comienzo el inicio de un proceso denominado metaciclogénesis.

Después de 1-2 semanas el parásito disminuye su capacidad de replicación y, pasando por las formas de “promastigotes nectomonados” y “promastigotes leptomonados”, se diferencia a una forma alargada llamada “promastigote metacíclico”, siendo esta última la forma infecciosa para el hospedador mamífero estando ubicada en la parte anterior del intestino del mosquito. Esta forma del parásito es depositada en el interior de la piel de un nuevo hospedador mamífero cuando el mosquito se alimenta nuevamente de sangre, transmitiéndose así la enfermedad.<sup>36</sup>

En la célula huésped del mamífero, el ciclo de vida de *Leishmania* es el de un patógeno intracelular obligado, que infecta preferencialmente células hematopoyéticas de la línea monocito/macrófago en las cuales entra por fagocitosis, teniendo la capacidad de evadir la respuesta inmune una vez dentro de ellas, infectando de la misma manera neutrófilos, células dendríticas y fibroblastos.<sup>40</sup>

La orientación en la que los promastigotes entran en la célula no es aleatoria, produciéndose la interacción con la célula huésped por el extremo, base del flagelo o por el polo posterior, dependiendo de la especie de *Leishmania*. También se ha descubierto que el parásito desarrolla diferentes estrategias para invadir los macrófagos huésped así como el papel muy importante que presentan en la fagocitosis los anticuerpos y receptores Fcγ.

Después de su internalización, los promastigotes se ubican preferentemente en el interior de la vacuola parasitófora (VP), donde inician su proceso de transformación en amastigotes. La forma en que se ubican los amastigotes en el interior de la vacuola no es homogénea, observándose una heterogeneidad dependiente de la especie del parásito y pudiendo contener cada vacuola un solo parásito o varios.<sup>41</sup>

Varios días después de iniciada la infección, las vacuolas parasitóforas que contienen amastigotes se acumulan en la periferia de la célula, permitiendo la posterior liberación de los amastigotes al exterior de la célula en un proceso que al parecer es mediado por la maquinaria exocítica celular. Los amastigotes libres tienen la capacidad de infectar las células circundantes manteniendo la infección.<sup>42</sup>

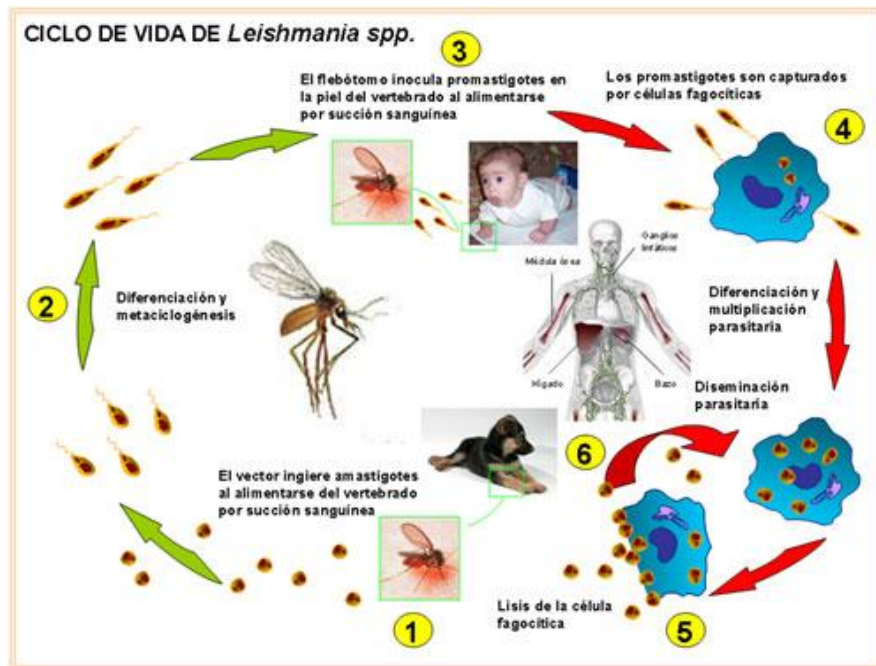


Figura 18. Ciclo biológico de *Leishmania*.<sup>43</sup>

## 20. Tipos de *Leishmania* y sintomatología.

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis son variables y están relacionadas con la cepa del parásito, el medio ambiente y la respuesta inmune del huésped. Cuatro diferentes formas clínicas están bien caracterizadas: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea, leishmaniasis cutánea difusa y leishmaniasis visceral.

### - *Leishmaniasis cutánea*

Las especies responsables de este tipo de leishmaniasis en el Viejo Mundo son *L. tropica* (*L. major*, *minor* y *aethiopica*), y en los países mediterráneos se ha identificado recientemente *L. donovani infantum*. En el Nuevo Mundo son responsables *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezolensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana*.

La aparición de las lesiones cutáneas a veces se encuentra asociada con la picadura del vector, sin embargo, a pesar del período de incubación para desarrollar la enfermedad clínica evidente puede variar de semanas a meses.<sup>44</sup>

En general estas lesiones respetan palmas, plantas y cuero cabelludo, siendo la especie de *Leishmania* infectante, la localización de la lesión y la respuesta inmune del huésped los principales determinantes para las manifestaciones clínicas y la cronicidad de las lesiones no tratadas.

Se ha relatado como un signo precoz en los casos de leishmaniasis cutánea la aparición de nódulos linfáticos satélites. El inicio de los síntomas linfáticos puede aparecer antes, simultáneamente o después de la ulceración de la piel, y en casos muy raros podría inclusive ser el único diagnóstico de la infección.

La forma cutánea de la leishmaniasis se caracteriza por presentar lesiones muy particulares, siendo las más frecuentes las lesiones de tipo ulcerosas. Las primeras manifestaciones son pequeñas lesiones caracterizadas por máculas rosadas o rojas, pruriginosas, del tamaño de la cabeza de un alfiler o una lenteja, que tiene semejanza con las picaduras de los insectos, a los pocos días éstas se elevan y adquieren un carácter papuloso, presentando una base firme, indurada e hiperémica.<sup>45</sup>

Después de varios días, esta lesión inicial se ulcera espontáneamente y se recubre de un líquido amarillento y adherente, que posteriormente da lugar a costra. Debajo de ésta, la lesión se extiende en superficie y profundidad, pudiendo además aparecer lesiones satélites que pueden unirse a la inicial y dar lugar a una gran ulceración.

En los primeros meses de evolución de la enfermedad, cuando la relación parásito-huésped muestra un desequilibrio a favor del primero, la úlcera tiende a crecer hasta un tamaño máximo que varía en función de la especie del parásito y de la respuesta inmune del huésped. Posteriormente, casi siempre las lesiones se estabilizan y a medida que empieza a prevalecer la reacción del huésped, la enfermedad tiende a evolucionar hacia la cura espontánea, abarcando en la mayoría de las ocasiones un periodo de 6 meses a 3 años.

Otra forma de presentación puede ser la forma nodular con superficie lisa que puede ulcerarse, observándose en ocasiones alrededor de una lesión ulcerosa central o de la cicatriz que dejó, la formación de varios nódulos; aspecto bastante típico de la leishmaniasis.

- *Leishmaniasis mucocutánea*

La lesión cutánea primaria producida por *L. braziliensis*, puede evolucionar a esta forma de leishmaniasis conocida como espundia (ayudada con frecuencia por sobreinfección bacteriana asociada).

Las lesiones mucosas secundarias pueden aparecer existiendo todavía las manifestaciones cutáneas o cuando estas ya han cicatrizado, siendo esta última el caso más frecuente.

En aproximadamente un tercio de los pacientes, la enfermedad se manifiesta primariamente en las mucosas sin prestar antecedentes de lesiones en la piel. En los casos de lesiones mucosas ya no existe la tendencia a la cura espontánea.

La leishmaniasis mucocutánea en los primeros años de su evolución compromete muy poco el estado general, sin embargo cuando las lesiones mucosas están muy avanzadas y comprometen la mucosa de la boca y de la laringe, alteran la alimentación y la respiración con el consiguiente compromiso del estado general. En estas condiciones donde también se encuentra dificultad para la alimentación, los

enfermos presentan desnutrición con la consiguiente aparición de otras infecciones sobre agregadas como la tuberculosis. Este tipo de pacientes con lesiones severas, si no son tratados, pueden llegar incluso a la muerte por una complicación aguda.

- *Leishmaniasis cutánea difusa*

Un aspecto peculiar de la leishmaniasis cutánea es observado en la forma llamada difusa o hansenoide, observada en infecciones causadas por *L. amazonensis*. La enfermedad se caracteriza por la presencia de nódulos aislados o agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas y en algunos casos lesiones verrucosas. Las lesiones muestran generalmente límites imprecisos que se confunden con la piel normal, dando a la enfermedad un aspecto que recuerda a la lepra lepromatosa.<sup>46</sup>

La enfermedad parece iniciarse bajo la forma de lesiones localizadas, de aspecto nodular o en placa infiltrada que poco a poco se disemina por todo el cuerpo. Estas lesiones no curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento.

- *Leishmaniasis visceral*

La leishmaniasis visceral, conocida también como Kala-Azar, fiebre Dum-Dum, esplenomegalia tropical, etc., es una enfermedad infecciosa sistémica, aguda o crónica, que afecta preferentemente al hígado, bazo, ganglios y con menos frecuencia a otros órganos como riñón, aparato digestivo y sistema nervioso central. Las especies del parásito responsables de la leishmaniasis visceral son *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*.

Después de la picadura del vector, existe un periodo de incubación que varía entre los 4 y 10 meses, cuando ocurre la invasión visceral se inicia la fiebre, casi siempre progresiva y elevada, remitente o intermitente, que dura semanas y se alterna con periodos afebriles, también de semanas.

El bazo crece gradualmente y sobrepasa el reborde costal. En la fase crónica la esplenomegalia es muy marcada y puede llegar hasta la fosa ilíaca derecha abultando considerablemente el abdomen. Después de varios meses de enfermedad, el paciente llega a la emanación, generalmente con edema de miembros inferiores, presentando anemia, leucopenia y trombocitopenia. La mayoría de los niños no tratados mueren pocos meses después de iniciada la enfermedad.

## **21. Detección y diagnóstico**

### *- Clínico-epidemiológico*

Se debe sospechar leishmaniasis superficial en casos con lesiones activas tanto de piel como de mucosas, especialmente úlceras que no hayan cedido a la terapéutica tradicional, en individuos procedentes de zonas endémicas.

Se debe sospechar leishmaniasis visceral en todo paciente portador de un cuadro febril prolongado, acompañado de hepatoesplenomegalia, palidez y enflaquecimiento progresivo.

Aunque este enfoque puede ser útil en el diagnóstico de la leishmaniasis, la demostración real del parásito es importante y definitiva.

### *- Diagnóstico de laboratorio*

#### • Demostración del parásito

Mediante métodos directos de observación de microorganismos que se ponen de manifiesto por la detección de amastigotes en muestras de tejidos infectados, pudiendo aparecer intracelularmente o libres tras la ruptura de las células. Se puede realizar un frotis por aposición que se colorea con tinción Giemsa, y practicar una biopsia, pudiéndose examinar el tejido histológicamente.

Con respecto a los métodos indirectos, destacan los medios de cultivo monofásico, bifásico y líquido, que pueden detectar el estadio promastigote, y la homogenización de tejidos para inyectarlo en un animal de experimentación.

#### • Métodos inmunológicos

Destaca la reacción intradérmica (RID) que consiste en una reacción de hipersensibilidad tardía muy útil en los casos no recientes de infección en leishmaniasis cutánea o mucocutánea. Otra prueba es la del formol gelificado que consiste en la opacificación y coagulación del suero que produce una inversión de la relación albúmina/globulina, el problema reside en que es una prueba inespecífica ya que varias enfermedades pueden provocar alteraciones proteicas en el suero. La reacción de fijación del complemento (RFC) es altamente sensible aunque con baja especificidad, y se realiza con antígeno homólogo o con antígeno



heterólogo de bacilos alcohol-resistentes. Otras técnicas conocidas en serología como la inmunofluorescencia indirecta, la inhibición de la hemaglutinación, la contrainmunolectroforesis y el ELISA, también son empleadas en el diagnóstico.

• Métodos auxiliares

La hematología es muy importante en casos de anemia, leucopenia, linfocitosis y trombocitopenia. Se realiza también electroforesis para el estudio de las proteínas séricas, como el caso de la hiperganmaglobulinemia e hipoalbuminemia en Kala-Azar.

## **22. Medidas de control y prevención de la leishmaniasis**

Actualmente existen varias vacunas aunque sus resultados no son totalmente eficientes, una de las estrategias consiste en el desarrollo de anticuerpos que impidan al parásito reconocer los puntos de entrada a la célula. A pesar de ello, la complejidad del ciclo vital del parásito así como su interacción con el huésped dificultan una respuesta inmune. También se ha desarrollado la vacunación genética, utilizando ADN produciendo una respuesta protectora contra varios patógenos, ya que induce una resistencia a la infección mediante activación de linfocitos T<sub>CD8+</sub> y la producción de interleuquina-12 e interferón.

Otros genes de *Leishmania* que han sido ampliamente utilizados en cepas del Viejo Mundo son las histonas, moléculas inmunológicamente relevantes durante la enfermedad que han generado una protección efectiva frente a un nuevo reto frente a cepas homólogas.

Ningún fármaco ni vacuna se ha mostrado eficaz en el control de la enfermedad, haciendo necesario utilizar otras medidas como la quimioterapia y la prevención de la transmisión del parásito desde el mosquito.<sup>47</sup> Por ello es importante tener en cuenta una serie de factores para prevenir la picadura del mosquito, como por ejemplo el evitar estar expuesto al aire libre en las horas de máxima actividad del mosquito (durante el anochecer y el amanecer), el uso de redes protectoras o la aplicación de repelentes como la *N,N*-dietilmetiltoluamida.

Igualmente importantes son las medidas de salud pública para reducir las poblaciones del mosquito como el control de animales domésticos y el rociamiento con insecticidas o destrucción de las madrigueras de éstos.<sup>48</sup>

## **23. Tratamiento**

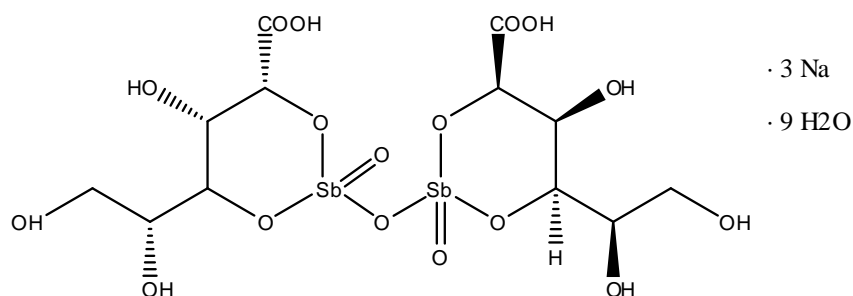
A pesar de la diversidad de compuestos disponibles para el tratamiento de la leishmaniasis, se sabe que *Leishmania* tiene la capacidad de responder a la presión de los medicamentos utilizando múltiples vías; esta propiedad del parásito genera múltiples fallas terapéuticas y favorece el incremento de cepas resistentes a los medicamentos ya existentes.

Lo expuesto anteriormente hace que la búsqueda de nuevos medicamentos útiles para el control de la leishmaniasis sea una meta imperativa. A continuación se hace una descripción general de los medicamentos utilizados para el tratamiento de la enfermedad:

### **• Antimoniales pentavalentes**

En este grupo de medicamentos se encuentran el estibogluconato de sodio (Pentostam®), aplicado clínicamente desde hace casi un siglo y el antimonio de meglumina (Glucantime®). En un principio se utilizaron antimoniales trivalentes (SbIII), pero después se comprobó que los antimoniales pentavalentes (SbV) eran más efectivos contra la leishmaniasis visceral, al mismo tiempo que menos tóxicos.

El tratamiento de todos los tipos de leishmaniasis está basado fundamentalmente en este tipo de medicamentos (figura 19). Sin embargo, el incremento de cepas de *Leishmania* resistentes a estos fármacos ha generado un grave problema, llegando a ser efectivo el tratamiento en algunas zonas en torno al 50%. Aunque el mecanismo de acción preciso de este fármaco no es totalmente conocido, se ha consensuado que actúa en varias dianas inhibiendo la glicólisis, la oxidación de ácidos grasos y la inhibición de la fosforilación de ADP del parásito. De la misma manera se ha demostrado que los antimoniales pueden bloquear los grupos SH de las proteínas de amastigotes y bloquear la topoisomerasa I. Recientemente se comprobó que este tipo de fármacos puede alterar el equilibrio redox-tioles siendo el parásito más susceptible al estrés oxidativo.



**Figura 19.** Estructura química del Pentostam®.

### • Anfotericina B (AmB)

La anfotericina B es un antibiótico macrólido anti-fúngico aislado de la bacteria *Streptomyces nodosus*, que posee una excelente actividad antileishmaniásica (figura 20). Su modo de acción está asociado a la interacción de este medicamento con los esteroides presentes en la membrana celular; esta interacción induce la formación de poros en la membrana celular que facilitan la entrada de cationes y aniones llevando al parásito a la muerte debido a los cambios osmóticos.<sup>49</sup>

En lugares con mucha incidencia de leishmaniasis visceral, donde la resistencia a los antimoniales es muy alta, este medicamento es una buena fuente de elección con porcentajes de cura del 96% como es el caso de la región al norte de la India.<sup>50</sup>

Los factores limitantes del uso de este medicamento se basan en su posible toxicidad, produciendo miocarditis y disfunción renal, por lo que durante su administración es necesaria la hospitalización con monitorización constante. Hasta la fecha no se han detectado casos de leishmaniasis con resistencia a anfotericina B; sin embargo, en estudios realizados *in vitro* se han producido clones de *L. donovani* resistentes a este medicamento.

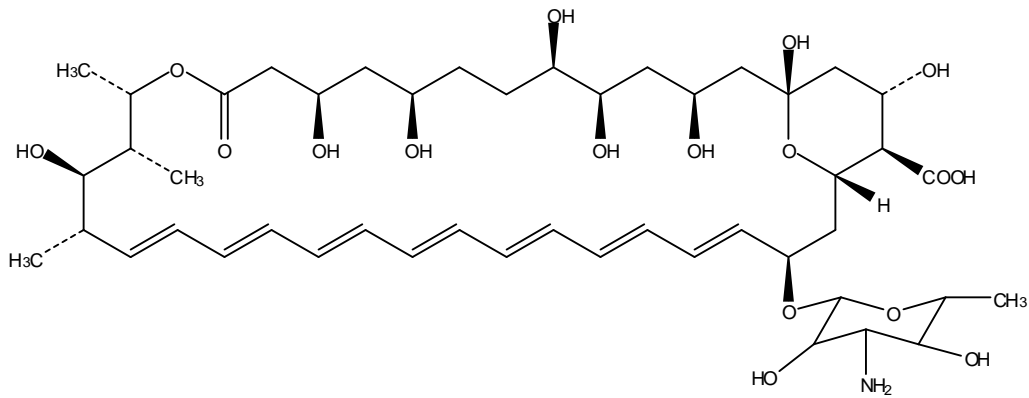


Figura 20. Estructura de la anfotericina B.

#### • *Anfotericina B liposomal (L-AmB)*

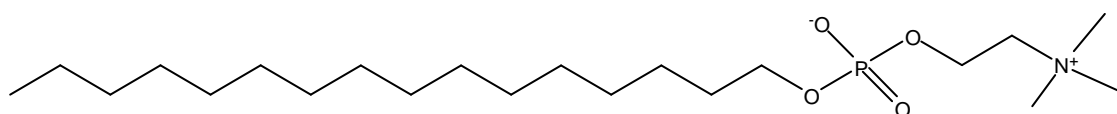
La aplicación clínica de este medicamento ha demostrado ser uno de los avances más sobresalientes en el tratamiento de la leishmaniasis. Se ha demostrado que este tipo de medicamento aplicado a pacientes con leishmaniasis visceral en la India, en dosis de 15 mg/kg y durante periodos que oscilan entre 1 y 5 días, tiene una eficacia del 97-100%. Este tipo de estudios caracterizó a la L-AmB como un medicamento de alta capacidad leishmanicida, baja toxicidad y de administración durante periodos cortos lo cual reduce los días de hospitalización.<sup>51</sup> Desafortunadamente, y debido al elevado coste de este medicamento en el mercado, esta dosis única altamente atractiva permanece inaccesible para muchos pacientes enfermos con leishmaniasis.

#### • *Miltefosina*

Los análogos de los lisofosfolípidos (LPAs) comprenden un grupo de compuestos metabólicamente estables que además de servir como agentes antitumorales tienen una potente actividad antiparasitaria, particularmente contra parásitos tripanosomátidos como *Leishmania*. Este grupo de compuestos incluye los alquil-fosfocolina tales como la miltefosina (hexadecilfosfocolina). Actualmente es usada en varias zonas afectadas, tanto por leishmaniasis cutánea como visceral, con una eficiencia que oscila entre el 95% y el 100%.

Su mecanismo de acción se relaciona con la modulación de receptores de superficie, el metabolismo de inositol, la activación de la fosfolipasa, la proteína quinasa C y otras vías mitogénicas que finalmente conducen a un proceso similar a la apoptosis celular.<sup>52</sup>

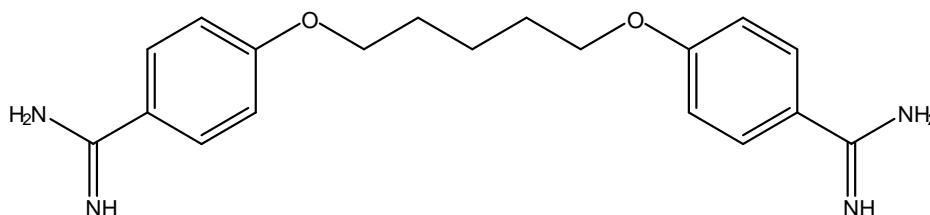
La miltefosina fue recientemente introducida en el esquema de tratamiento clínico de la leishmaniasis y es por esto que posiblemente no se haya detectado hasta el momento resistencia del parásito frente a este medicamento (figura 21).



**Figura 21.** Estructura de la miltefosina.

#### • *Pentamidina*

La pentamidina es un medicamento utilizado principalmente como segunda opción en los casos de leishmaniasis visceral refractarias al tratamiento con antimoniales (figura 22). Sin embargo, su uso se ha discutido debido a la resistencia de *Leishmania* frente a él y a los efectos adversos que genera en los pacientes tratados. Actualmente se utiliza para el tratamiento de leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis cutánea, y aunque su mecanismo de acción no es totalmente conocido, se ha descubierto que se acumula principalmente en la mitocondria, donde potencia la acción de inhibidores del complejo II de la cadena respiratoria, y que inhibe la topoisomerasa II a nivel nuclear.<sup>53</sup>

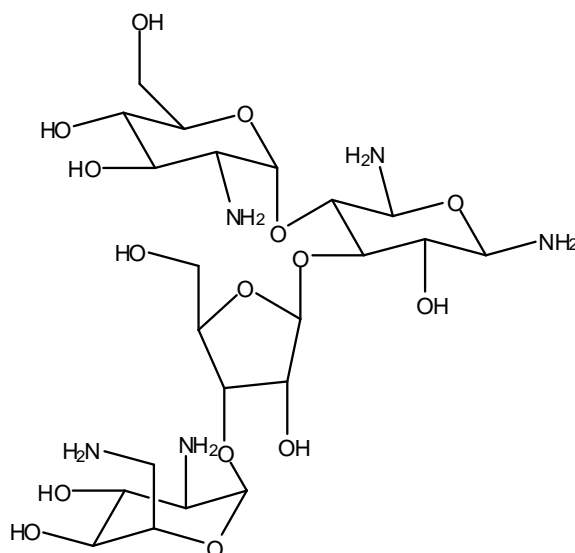


**Figura 22.** Estructura química de la pentamidina.

• **Paromomicina**

Este compuesto obtenido de cultivos de *Streptomyces rimosus* posee actividad tanto en bacterias como en protozoos (figura 23). Aunque su efecto leishmanicida se descubrió en 1960, no fue hasta los años 80 cuando se inició el uso tópico en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea y aplicación parenteral para leishmaniasis visceral. El mecanismo de acción de la paramomicina tiene como objeto principal el ribosoma del parásito.

Entre otros efectos que puede producir este fármaco se encuentran la alteración de la fluidez de la membrana celular, alteraciones en el metabolismo de lípidos y algunas actividades mitocondriales alterando el metabolismo energético celular.<sup>54</sup>

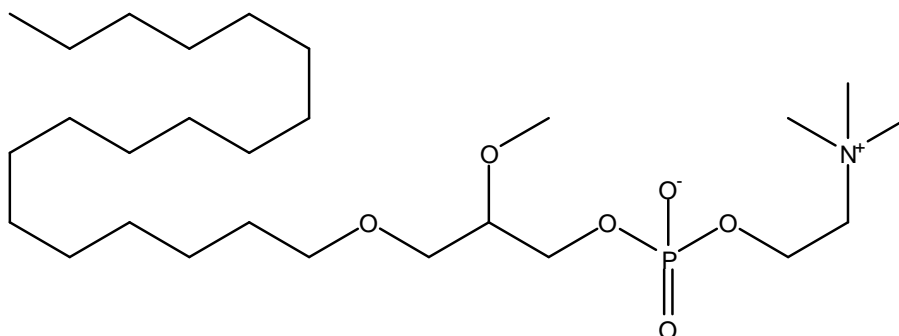


**Figura 23.** Estructura química de la paramomicina.

• **Edelfosina**

En un principio la miltefosina, edelfosina y algunos otros alquil-lisofosfolípidos fueron desarrollados como agentes anticarcinogénicos, pero se descubrió que inducían apoptosis en promastigotes de *Leishmania infantum*.

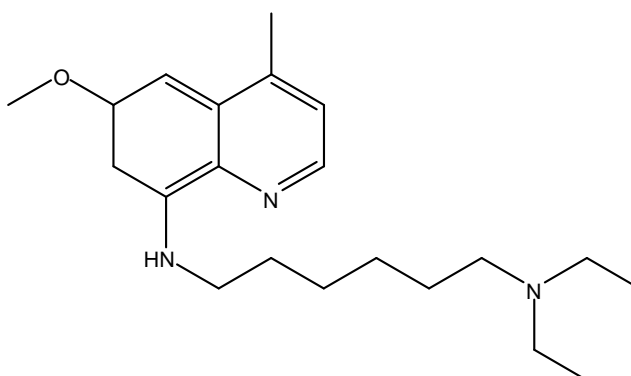
La edelfosina produce la muerte celular (figura 24), que puede ser regulada por la expresión ectópica de los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2 de las proteínas Bcl-X<sub>L</sub> y Hrk, lo que sugiere la similitud de este proceso con la apoptosis eucariota.<sup>55</sup>



**Figura 24.** Estructura química de la edelfosina.

#### • Sitamaquina

La sitamaquina es un fármaco en fase de estudio en estos momentos con expectativas muy esperanzadoras en el tratamiento de la leishmaniasis (figura 25), y aunque su mecanismo de acción es desconocido, se piensa que afecta a la cadena transportadora de electrones de la mitocondria.



**Figura 25.** Estructura química de la sitamaquina.

## 24. Tratamientos actuales

Los regímenes terapéuticos en leishmania son muy diversos ya que dependen de varios factores como las características del paciente, la especie de *Leishmania* que infecta y la zona donde se contrae la enfermedad. Según la OMS el tratamiento actual frente a la leishmaniasis es el representado en las tablas 2 y 3:

**Tabla 2.** Tratamiento actual frente a la leishmaniasis visceral.<sup>56</sup>

<b>Compuesto</b>	<b>Régimen de tratamiento</b>
L-AmB 10 mg/kg	1 día
L-AmB 20 mg/kg	2-4 días
Anfotericina B desoxicolato 1 mg/kg	30 días (días alternos)
Miltefosina 100 mg/día	28 días
Paromomicina 15 mg/kg/día	21 días
Estibogluconato de sodio 20 mg/kg/día	30 días
Antimoniato de meglumina 20 mg/kg/día	30 días
L-AmB 5mg/kg + miltefosina 100 mg/día	8 días
L-AmB 5mg/kg + paromomicina 15 mg/kg/día	11 días
Miltefosina 15 mg/día + paromomicina 15 mg/kg/día	10 días
Estibogluconato de sodio 20mg/kg/día + paromomicina 15 mg/kg/día	17 días

**Tabla 3.** Tratamiento actual frente a leishmaniasis cutánea.<sup>56</sup>

<b>Compuesto</b>	<b>Régimen de tratamiento</b>
Estibogluconato de sodio (sistémica) 20 mg/kg/día	20 días
Estibogluconato de sodio (intralesionar)	Hasta que la lesión se haya curado
Antimoniato de meglumina (sistémica) 20 mg/kg/día	20 días
Antimoniato de meglumina (intralesionar)	Hasta que la lesión se haya curado
Pentamidina	Superior a 4 meses

La ausencia de vacunas efectivas, la aparición de resistencias a estas terapias, así como la toxicidad de las mismas y su elevado coste, hacen necesario la búsqueda de nuevos compuestos contra la leishmaniasis.



**IV. QUINOXALINAS.  
FRAGMENTO  
PRIVILEGIADO EN  
MALARIA Y  
LEISHMANIASIS**



## 25. Quinoxalinas, una estructura química con un amplio rango de actividades biológicas

Las quinoxalinas, también conocidas como 1,4-benzodiazinas, son biciclos aromáticos que presentan dos átomos de nitrógeno en posiciones 1 y 4 (figura 26). La quinoxalina se ha descrito como un bioisómero de quinolina, naftil y algunos otros anillos heteroaromáticos incluyendo la pirazina (figura 26).<sup>57</sup>

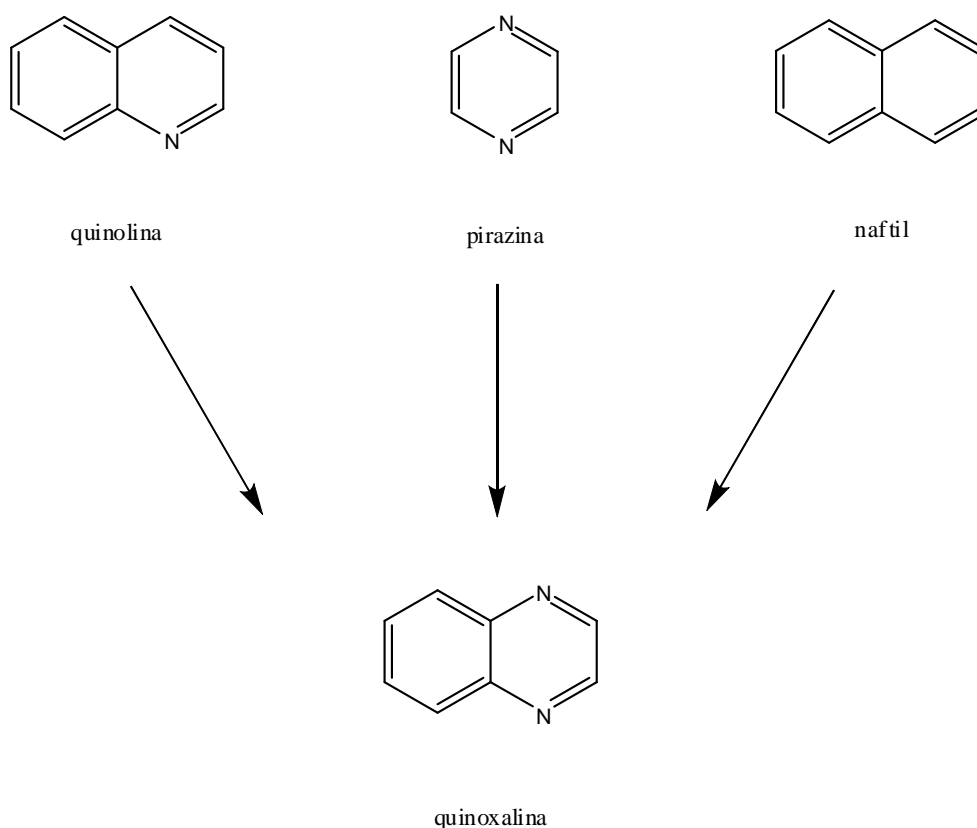
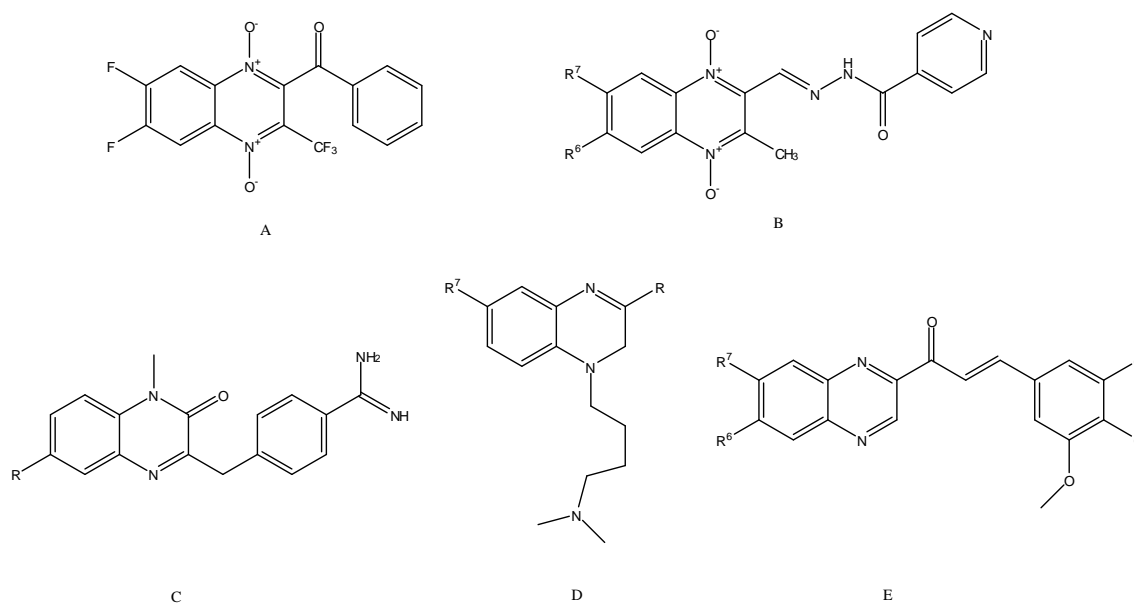


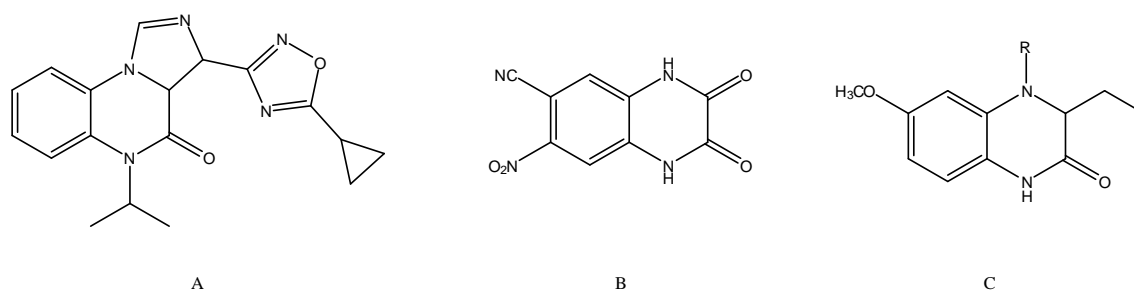
Figura 26. Estructura de la quinoxalina y sus bioisómeros.

Los derivados de quinoxalina son un tipo de compuestos de gran interés en el campo de la química médica, debido a que presentan un amplio rango de propiedades biológicas como anticancerosos<sup>58-63</sup>, antituberculosos<sup>61-67</sup>, anticoagulantes<sup>68,69</sup>, analgésicos<sup>68-71</sup>, antiinflamatorios y antioxidantes<sup>72-75</sup>. En la figura 27, se muestran una serie de derivados de quinoxalina con diferentes actividades biológicas.



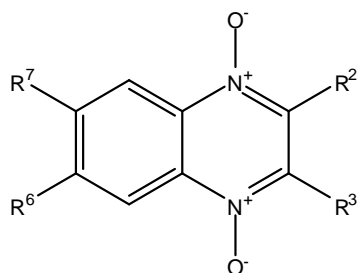
**Figura 27.** Estructura de derivados de quinoxalina con actividad biológica: A-anticancerosa, B-antituberculosa, C-anticoagulante, D-analgésica, E-antiinflamatoria y antioxidante.

También se han publicado varios artículos en los que derivados de quinoxalina y quinoxalinonas han sido estudiadas como potenciales agentes en el sistema nervioso central<sup>76-79</sup> y agentes antivirales como anti VIH-1 (inhibidores de la retrotranscriptasa)<sup>80-82</sup> (figura 28).



**Figura 28.** Estructura de quinoxalinona con propiedades ansiolíticas (A), como inhibidora de receptores AMPA (B), y estructura de derivado de quinoxalina con actividad anti VIH-1 (C).

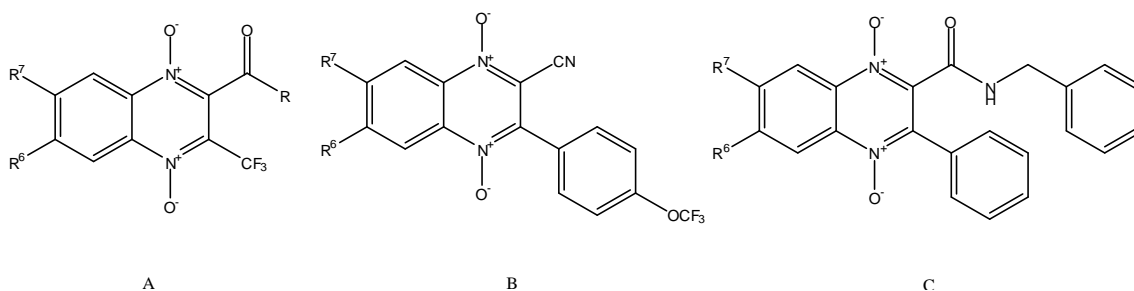
La oxidación de ambos nitrógenos de este sistema heterocíclico conlleva la obtención de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina (figura 29), aumentando el número de propiedades biológicas.<sup>83</sup> Se ha comprobado que los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina mejoran los resultados biológicos mostrados por sus análogos reducidos como antivirales, anticancerosos,<sup>84-86</sup> anticándida,<sup>87-89</sup> antibacteriano,<sup>90-95</sup> y antiprotozoario<sup>96,97</sup>.



**Figura 29.** Estructura general de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina.

De hecho, desde los años 40, las quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido fueron conocidas como potentes agentes antibacterianos y han sido utilizadas como suplementos alimentarios para el crecimiento animal.<sup>95,98,99</sup>

Como resultado de diferentes proyectos de investigación, nuestro grupo ha sintetizado diferentes series de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina, con una gran variedad de sustituyentes en posición 2, 3, 6 y 7 (figura 29). Con relación a la posición 2, nuestro grupo ha trabajado principalmente con grupos carbonitrilo, cetona, éster y derivados de amidas (figura 30). Grupos metil, fenil, trifluorometil, amino o piperazinil son algunos de los sustituyentes estudiados en posición 3. Y finalmente grupos donadores y aceptores de electrones han sido considerados en las posiciones 6 y 7 del anillo aromático. Estos trabajos han permitido identificar a los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina como receptores antagonistas de serotonina<sup>100</sup>, inhibidores quinasa<sup>101</sup>, antihipertensivos y anticoagulantes<sup>102</sup>, antituberculosos<sup>103-105</sup>, antimaláricos<sup>106-111</sup>, antichagásicos<sup>96,97,112</sup>, leishmanicidas<sup>113</sup>, antitumorales<sup>114-116</sup>, antiinflamatorios y agentes antioxidantes<sup>74,75</sup>.



**Figura 30.** Estructura de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina con actividad biológica: A- antitumoral, B-antichagásica, C-antituberculosa.

## 26. Derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina y malaria

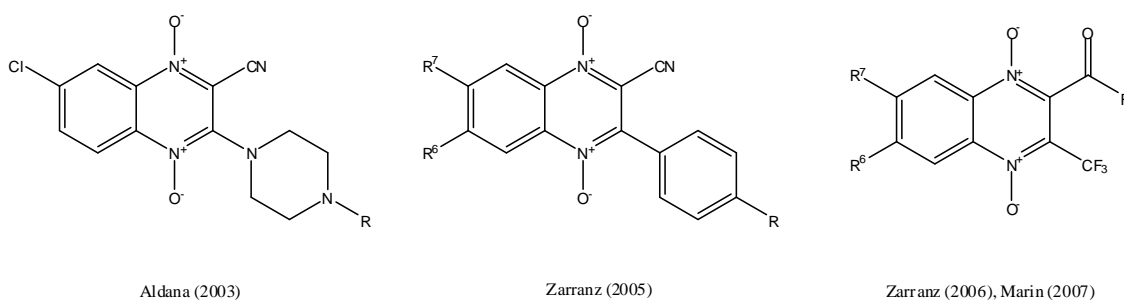
Tanto la similitud entre quinolinas y quinoxalinas, como la presencia de parte de las quinoxalinas en un amplio espectro de antibióticos, hizo pensar que las quinoxalinas análogas de quinolinas antimaláricas exhibirían dicha actividad.

La primera publicación que hace referencia a los derivados de quinoxalina como agentes antiplasmodiales data de 1948<sup>117</sup>, aunque los primeros estudios continuados datan de principios de los años 70.<sup>118-121</sup> El equipo de Moreno y Schultz testó la actividad antimalárica frente a *Plasmodium berghei* en ratones, con derivados de la 2-quinoxalinametanol, 2-quinoxalinil cetoximas y 5,8-dimetoxiquinoxalina.

Posteriormente Djudovic en 1976 y Rangisetty en 2001, quien evaluó la actividad antimalárica de nuevos derivados de arilaminoquinoxalinas frente a *Plasmodium yoelii* en ratones a una dosis de 75 mg/kg, obtuvieron simplemente una moderada actividad.<sup>122,123</sup>

Parecía que la hipótesis falló, sin embargo, todos estos estudios se realizaron utilizando derivados de quinoxalina reducida. Basándose en la idea de que los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina mejoraban la actividad antimicobacteriana con respecto a sus análogos reducidos, nuestro grupo decidió llevar a cabo la evaluación *in vitro* de algunos de nuestros compuestos di-*N*-óxido frente a *Plasmodium falciparum*.

Por tanto, comenzamos estudiando la actividad antiplasmódica de los derivados del 2-ciano-7-cloroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido, mostrando valores de  $CI_{50} = 0,05 \mu M$  y  $12,6 \mu M$  en la cepa F32-Tanzania (sensible a la cloroquina), obteniéndose como compuesto líder el 2-ciano-7-cloro-3-[4-(2-metoxifenil)-piperazin-1-il]quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (figura 31).<sup>111</sup> Posteriormente se estudió la influencia de los grupos 1,4-di-*N*-óxido en el anillo de quinoxalina con respecto a la actividad antiplasmódica, confirmando su importancia mediante la comparación de los resultados de dicha actividad entre dos series: derivados del 3-aril-2-cianoquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido y derivados del 3-aril-2-ciano quinoxalina.<sup>110</sup> Concluyéndose en este trabajo que los derivados de quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido presentan una actividad antimalárica superior a los derivados reducidos. Además de los derivados de la quinoxalina-2-carbonitrilo 1,4-di-*N*-óxido, se estudió la actividad de otros derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina como los del 3-trifluorometilquinoxalina-2-carbonil.<sup>106,109</sup>



**Figura 31.** Estructura de algunos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina como agentes antiplasmódicos publicadas por nuestro grupo.

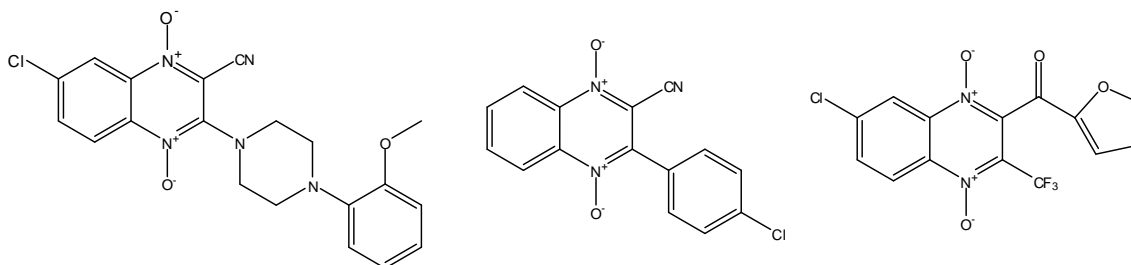
Mientras tanto, otro grupo realizó un intento con derivados reducidos de quinoxalina, siendo sintetizados y testados dieciocho pirroles y bispirroles [1,2-a]quinoxalina para observar su actividad *in vitro* en cepas de *Plasmodium falciparum*: Thain (cloroquina sensible), FcB1 y K1 (cloroquina resistentes). Los derivados bispirrol mostraron superior actividad antiplasmódica con respecto a los análogos monopirrol. Además, se observó que la presencia de un grupo metoxi en el núcleo del pirrol [1,2-a]quinoxalina aumentaba la actividad. Los efectos de los fármacos sobre la formación de  $\beta$ -hematina fueron ensayados, y mostraban similar o superior actividad inhibitoria que la cloroquina.<sup>124</sup>

En el año 2008, continuando con los esfuerzos del grupo, fueron sintetizados y evaluados frente a cepas cloroquina resistentes de *Plasmodium falciparum*, derivados del 2-arilcarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido. Los resultados del estudio relación estructura-actividad mostraban un aumento de la actividad con la presencia de átomos electroatrayentes en posiciones 6 o 7 del anillo y en derivados no sustituidos, y con la presencia de un pequeño anillo aromático unido a un grupo cetona (figura 32). El compuesto más activo y menos tóxico fue el 7-cloro-2-(2-furilcarbonil)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido.<sup>106</sup>

F32-Tanzania  
 $CI_{50}=0,05 \mu M$

FcB1 (CQ-res)  
 $CI_{50}=1,0 \mu M$

FcB1 (CQ-res)  
 $CI_{50}=0,1 \mu M$



**Figura 32.** Estructura de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina líderes como agentes antiplasmódicos publicadas por nuestro grupo.

Ese mismo año, fueron sintetizados y evaluados frente a *P. falciparum* nuevos derivados de la 3-fenilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido, y como resultado del estudio de relación estructura-actividad se observó la disminución de la actividad antiplasmódica cuando el grupo carbonitrilo era sustituido por otros, como un grupo éster o por un ácido carboxílico, confirmándose su carácter farmacóforo.<sup>108</sup>

## 27. Derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina y leishmaniasis

Debido a la actividad antiplasmódica de ciertos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina, algunos equipos de investigación ensayaron este tipo de derivados frente a otras enfermedades parasitarias como la leishmaniasis.

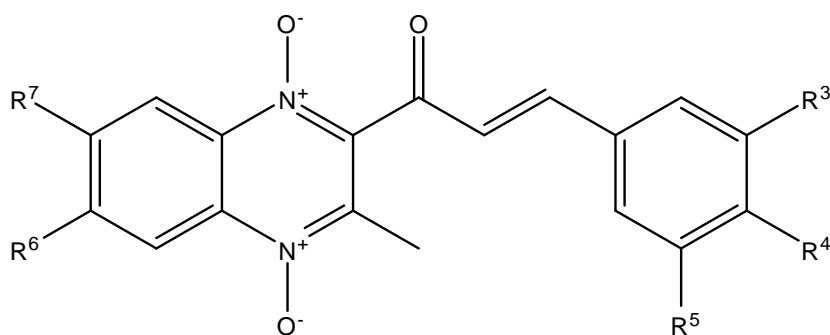
Estos trabajos son muy recientes y la primera publicación sobre derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina como agentes leishmanicidas data del año 2003.<sup>125</sup>

En 2006, una serie de 29 nuevos derivados de quinoxalina fueron sintetizados y evaluados *in vitro* frente a *Leishmania donovani* mostrando interesante actividad los que poseían grupos amida.<sup>126</sup>

Un año después, fue sintetizada una serie de derivados de pirroles [1,2-a]quinoxalina y evaluada frente a *L. amazonensis* y *L. infantum*, dejando de ser desde ese momento las quinoxalinas reducidas las únicas estudiadas frente a la leishmaniasis.<sup>127</sup>



En 2008, nuestro grupo basándose en su amplia experiencia en enfermedades infecciosas, comenzó una nueva línea de investigación frente a la leishmaniasis. Se sintetizaron y evaluaron *in vitro* frente a amastigotes de *Leishmania amazonensis*, derivados del 3-fenil-1-(1,4-di-*N*-óxido quinoxalin-2-il)-2-propen-1-ona (figura 33). El compuesto más activo fue el (2E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-1-(3,6,7-trimetil-1,4-dioxi-quinoxalin-2-il)-propenona, revelando la citotoxicidad en macrófagos que este producto es casi seis veces más activo que tóxico.<sup>113</sup>



**Figura 33.** Estructura química de los derivados del 3-fenil-1-(1,4-di-*N*-óxido quinoxalin-2-il)-2-propen-1-ona.

Finalmente, en 2011 fueron ensayados derivados de quinoxalinas (pirazoles y propenonas) frente a *Leishmania peruviana*, mostrando el compuesto 2,6-dimetil-3-f-quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido una inhibición del 50% del crecimiento del parásito a una concentración de 8,9  $\mu$ M con ningún impacto frente a células de riñón y con baja toxicidad frente a células THP-1 y macrófagos.<sup>128</sup>



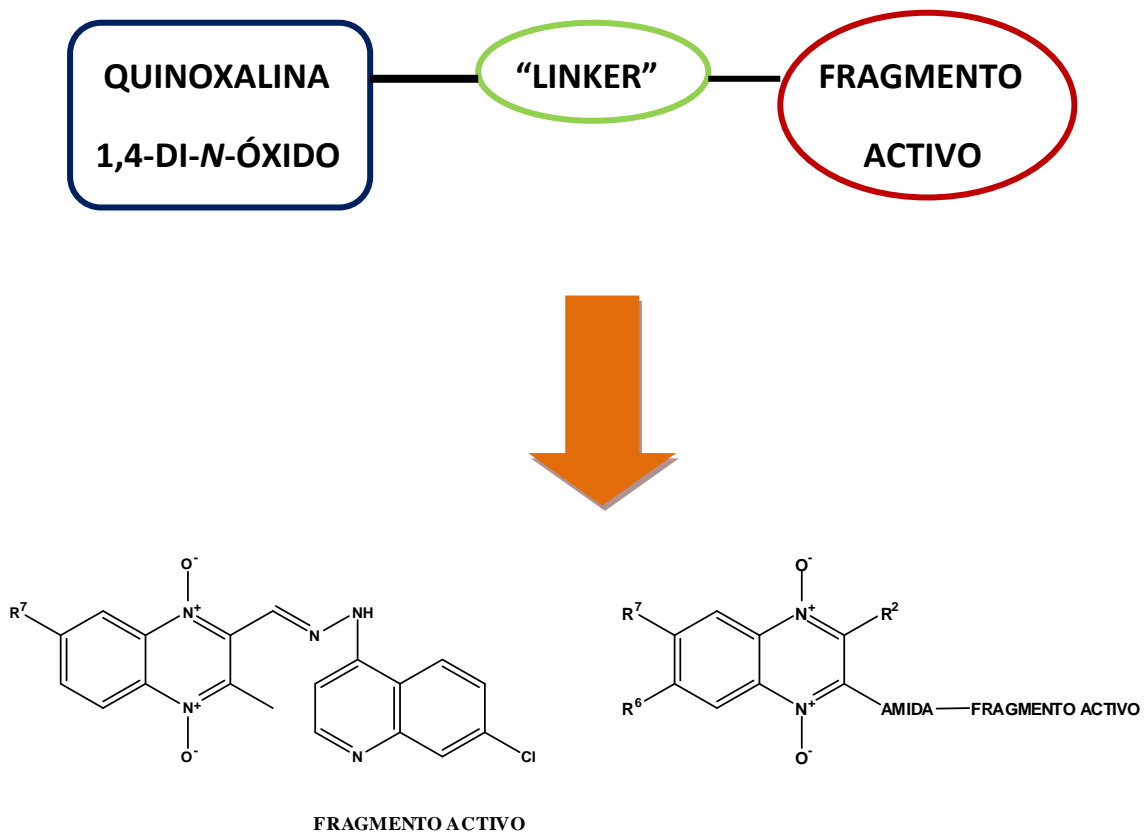
# **OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**



## **V. HIPÓTESIS DE TRABAJO**



El trabajo experimental presentado en esta memoria se basa principalmente en la síntesis de compuestos cuyo núcleo sea el doble anillo de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina, siguiendo una estrategia de unión de fragmentos biológicamente activos para desarrollar nuevos fármacos con potencial actividad antimalárica y leishmanicida (figura 34).



**Figura 34.** Modelos propuestos para el desarrollo del proyecto.





## **VI. OBJETIVOS**



El presente trabajo tiene como objetivo la búsqueda de nuevos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina para el tratamiento de la malaria y la leishmaniasis. El planteamiento consiste en el diseño y síntesis de varios derivados de cada serie, así como su evaluación biológica *in vitro* contra *P. falciparum* (malaria), *L. amazonensis* y *L. infantum* (leishmaniasis). Algunos de estos compuestos serán seleccionados en base a su variabilidad estructural y resultados biológicos, para, después realizar un estudio sobre la relación estructura-actividad.

Con la finalidad de alcanzar el principal propósito de este proyecto, han sido propuestos una serie de objetivos específicos:

- 1- Revisión bibliográfica de los fármacos con actividad antimalárica y leishmanicida publicados hasta la fecha.
- 2- Diseño de nuevos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina, con potencial actividad antimalárica y antileishmaniásica.
- 3- Síntesis de los compuestos diseñados.
- 4- Caracterización estructural de los compuestos sintetizados.
- 5- Evaluación biológica *in vitro* de los derivados sintetizados.
- 6- Estudio computacional y de relación estructura-actividad de los nuevos compuestos obtenidos.
- 7- Búsqueda de nuevos compuestos líder y optimización en el diseño de nuevos derivados.



## **VII. PLAN DE TRABAJO**



## 28. Revisión bibliográfica

Se llevará a cabo una amplia revisión tanto de los fármacos utilizados, como de las nuevas aproximaciones en la investigación de compuestos frente a malaria y leishmaniasis.

## 29. Diseño de nuevos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina

Continuando con la línea de investigación llevada a cabo por nuestro grupo para el desarrollo de agentes con actividad antimalárica y leishmanicida, se plantea la modificación estructural de anteriores derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina que han presentado buenas actividades antiparasitarias con el fin de obtener nuevos compuestos activos en el tratamiento de la malaria y la leishmaniasis.

El primer planteamiento propone la combinación de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina con un grupo carbonitrilo en posición 2, con diferentes estructuras (anillos aromáticos, ciclos y cadenas alifáticas) con actividad antimalárica y/o leishmanicida previamente consultadas tras una amplia revisión bibliográfica (figura 35).<sup>129-138</sup>

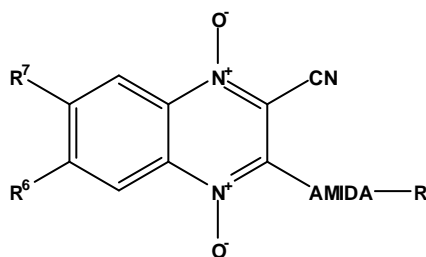
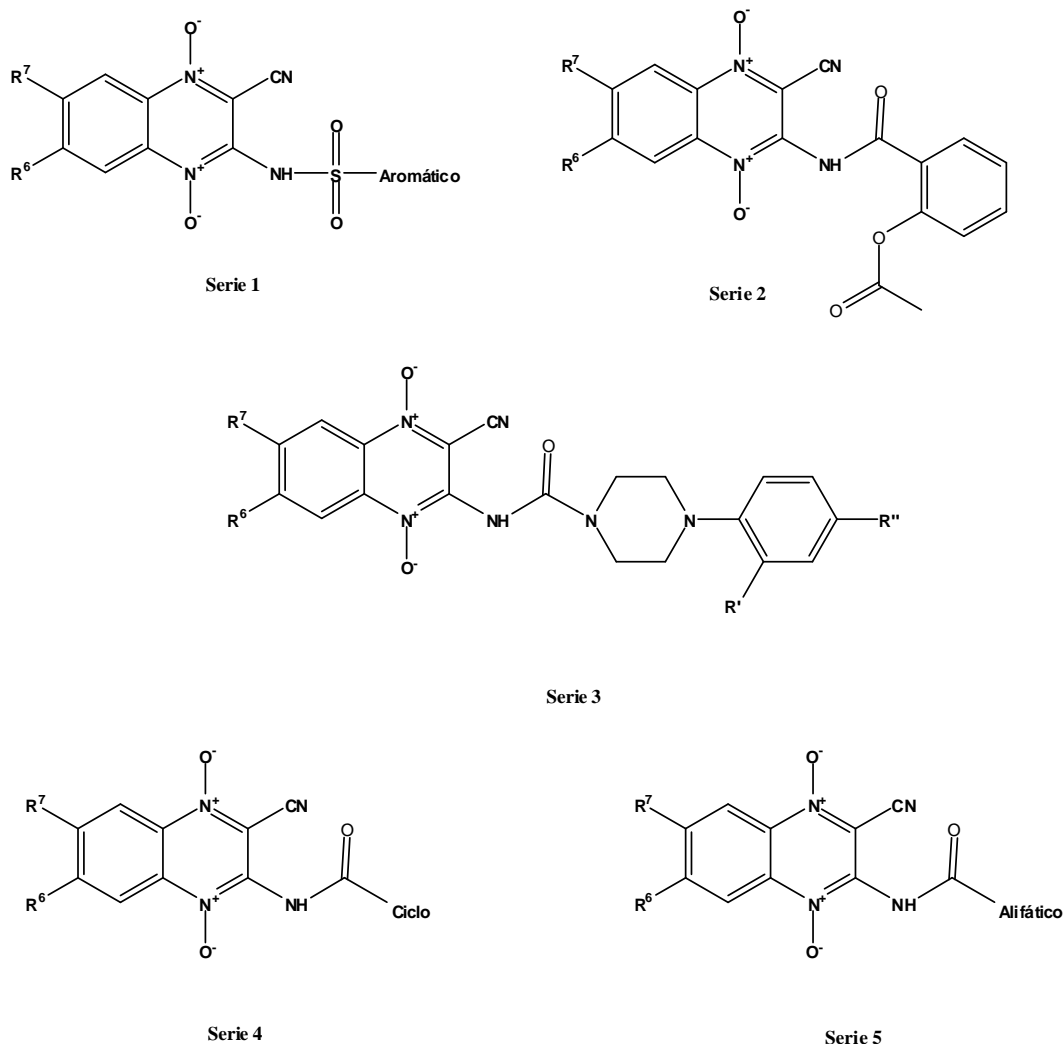


Figura 35. Modelo propuesto para los compuestos de las series 1-5.

Como se ha descrito anteriormente en la *Introducción* en relación a los derivados de quinoxalina y su actividad antiplasmódica y leishmanicida, estudios de relación estructura-actividad han observado la disminución de la actividad antiplasmódica cuando el grupo carbonitrilo es sustituido por otros grupos como un grupo éster o un ácido carboxílico, confirmándose su carácter farmacóforo.<sup>108</sup>

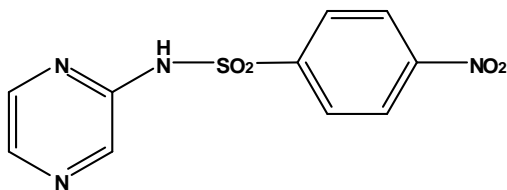
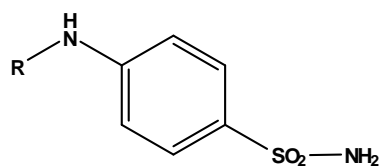
Partiendo de la estructura general que se muestra en la figura 35 se plantean 5 series de compuestos con distintas sustituciones en el grupo amino en posición 3 del doble anillo de quinoxalina (figura 36).



**Figura 36.** Diseño inicial de las series de compuestos 1-5.

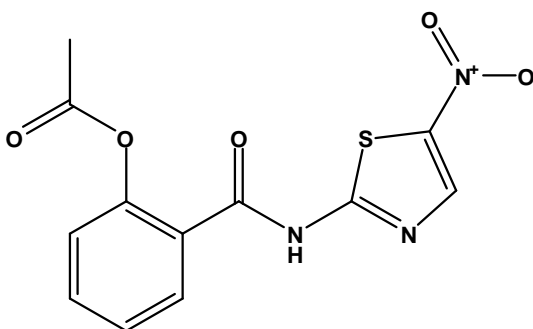
Recientemente, se ha descubierto que las sulfonamidas aromáticas/heterocíclicas (**serie 1**), muestran actividad leishmanicida debido a una fuerte actividad nucleasa en presencia de agentes reductores y Cu(II),<sup>129-131</sup> y que con respecto a malaria, actúan como inhibidores efectivos de la anhidrasa carbónica, una enzima necesaria para el crecimiento de *Plasmodium* y que se ha corroborado con ensayos *in vitro* de *Plasmodium falciparum* y con ensayos *in vivo* de *Plasmodium Berghei* (figura 37).<sup>132,133</sup>



Inhibición del 90,8% crecimiento (*L. infantum*)CI<sub>50</sub>=1 μM (*P. berghei*)

**Figura 37.** Sulfonamidas que han mostrado actividad leishmanicida y antiplasmódica.<sup>130-132</sup>

La nitazoxanida es un compuesto ampliamente estudiado como antiparasitario (figura 38), mostrando actividad frente a varias enfermedades como la leishmaniasis y la malaria.<sup>134,135</sup> Por ello, en la **serie 2** se procederá a la condensación de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina con ácido acetilsalicílico que forma parte de la estructura de la nitazoxanida.

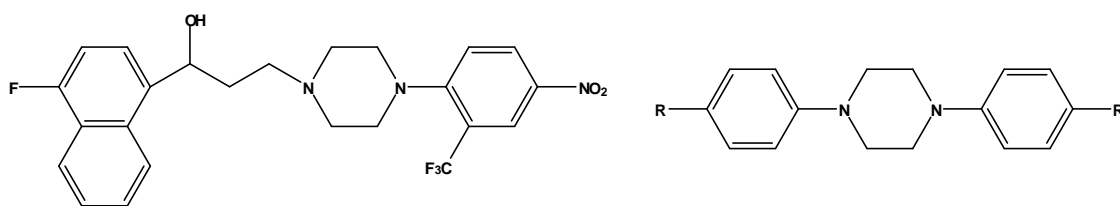


**Figura 38.** Estructura de la nitazoxanida.

Algunos de los sustituyentes derivados de fenilpiperazinas de la **serie 3**, han mostrado una actividad muy elevada frente a cepas de *Plasmodium falciparum* cloroquina-resistentes (FCR-3), actuando a nivel de la enzima plasmepsina II de *Plasmodium* relacionada con la degradación de hemoglobina.<sup>136,137</sup> Además, algunas fenilpiperazinas han mostrado una actividad leishmanicida hasta 7 veces superior a la pentamidina (figura 39).<sup>138</sup>

CI<sub>50</sub>= 0,5 μM (*P. falciparum* FCR-3)

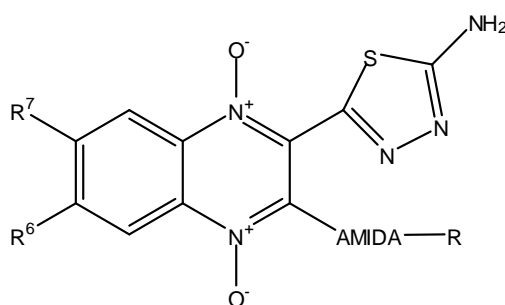
CI<sub>50</sub>= 0,4 μM (*L. donovani*)



**Figura 39.** Fenilpiperazinas que han mostrado actividad antiplasmódica y leishmanicida.<sup>137,138</sup>

Una vez condensados los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina mediante enlace amida con diferentes estructuras aromáticas, en las **series 4 y 5** se procederá a unir dichos derivados mediante dicho enlace con diferentes ciclos y cadenas alifáticas con vistas a estudios de relación estructura-actividad.

Con la finalidad de mejorar la actividad de los compuestos finales o confirmar el planteamiento anterior, el segundo planteamiento (**serie 6**) consiste en sustituir el grupo carbonitrilo situado en la posición 2 del doble anillo de quinoxalina, por un grupo tiodiazol-amina (figura 40) que ha mostrado actividad leishmanicida en la inducción de muerte celular en *Leishmania major*.<sup>139-141</sup>



**Figura 40.** Modelo propuesto para los compuestos de la serie 6.

El diseño del tercer planteamiento del proyecto, al igual que el primero, consiste en la hibridación molecular basada en la combinación de fragmentos de farmacóforos de diferentes sustancias bioactivas para producir nuevos compuestos híbridos con eficacia y afinidad mejorada con respecto a los compuestos de partida.<sup>142</sup> Para ello, se procederá a la condensación de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina con el fragmento

activo de la cloroquina: la 7-cloro-4-hidrazinilquinolina que ha mostrado principalmente actividad antimalárica, tanto en cepas cloroquino-resistentes como cloroquino-sensibles, y también actividad leishmanicida (figura 41).<sup>143-147</sup>

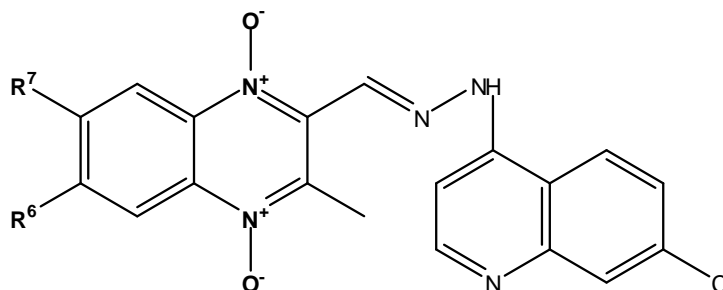


Figura 41. Modelo propuesto para los compuestos de la serie 7.

### 30. Síntesis de los compuestos diseñados

Una vez diseñados los compuestos finales, se establecen las rutas sintéticas. De forma general se puede describir la síntesis de todos los derivados como síntesis lineal.

La reacción de Beirut, utilizada para la preparación de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina presentes en este proyecto, es un ejemplo de este tipo de síntesis (figura 42).

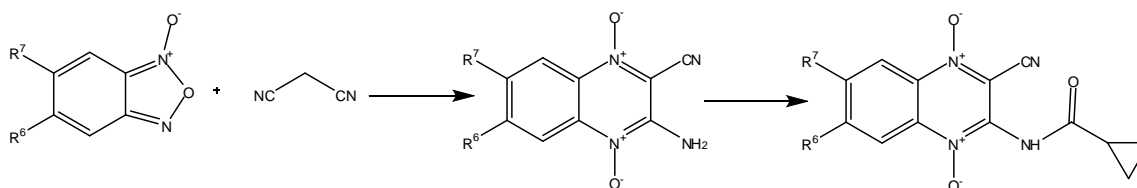


Figura 42. Síntesis lineal de los compuestos finales.

Finalmente, debido a que tanto la malaria como la leishmaniasis son enfermedades ligadas a la pobreza, habrá que tener en cuenta otros factores a la hora de seleccionar los métodos de síntesis en base a conseguir compuestos finales con costes reducidos, como la utilización de disolventes sencillos y baratos, o reactivos de coste asequible.

### **31. Caracterización estructural de los compuestos sintetizados**

Todos los compuestos sintetizados serán caracterizados químicamente por cromatografía en capa fina (CCF), espectroscopía infrarroja (IR), resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN), análisis elemental (CHN) y punto de fusión (PF).

### **32. Evaluación biológica *in vitro* de los derivados sintetizados**

La evaluación *in vitro* de la actividad antimalárica de la mayor parte de los compuestos sintetizados se llevará a cabo en la Universidad de Antioquía (Medellín, Colombia). En el caso de los compuestos **7b** y **7d**, serán evaluados por Glaxo Smith Kline (Tres Cantos, Madrid).

La evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida de los compuestos sintetizados así como los ensayos de toxicidad de los mismos se llevarán a cabo en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Perú), y posteriormente en la Universidad de Toulouse (Francia).

### **33. Estudio de relación estructura-actividad de los nuevos compuestos obtenidos**

La relación entre la actividad antiparasitaria de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina y sus estructuras serán estudiadas con el objetivo de determinar los requerimientos estructurales necesarios para mejorar la actividad antimalárica y leishmanicida de los derivados de quinoxalina.

### **34. Búsqueda de nuevos compuestos líder y optimización en el diseño de nuevos derivados**

Un estudio sobre la relación entre los resultados biológicos y la estructura química de los derivados, conducirá a la selección de nuevos compuestos líder. Este estudio y una amplia revisión bibliográfica permitirá definir un futuro plan de trabajo.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **VIII. SÍNTESIS QUÍMICA**





### 35. Esquema general de síntesis

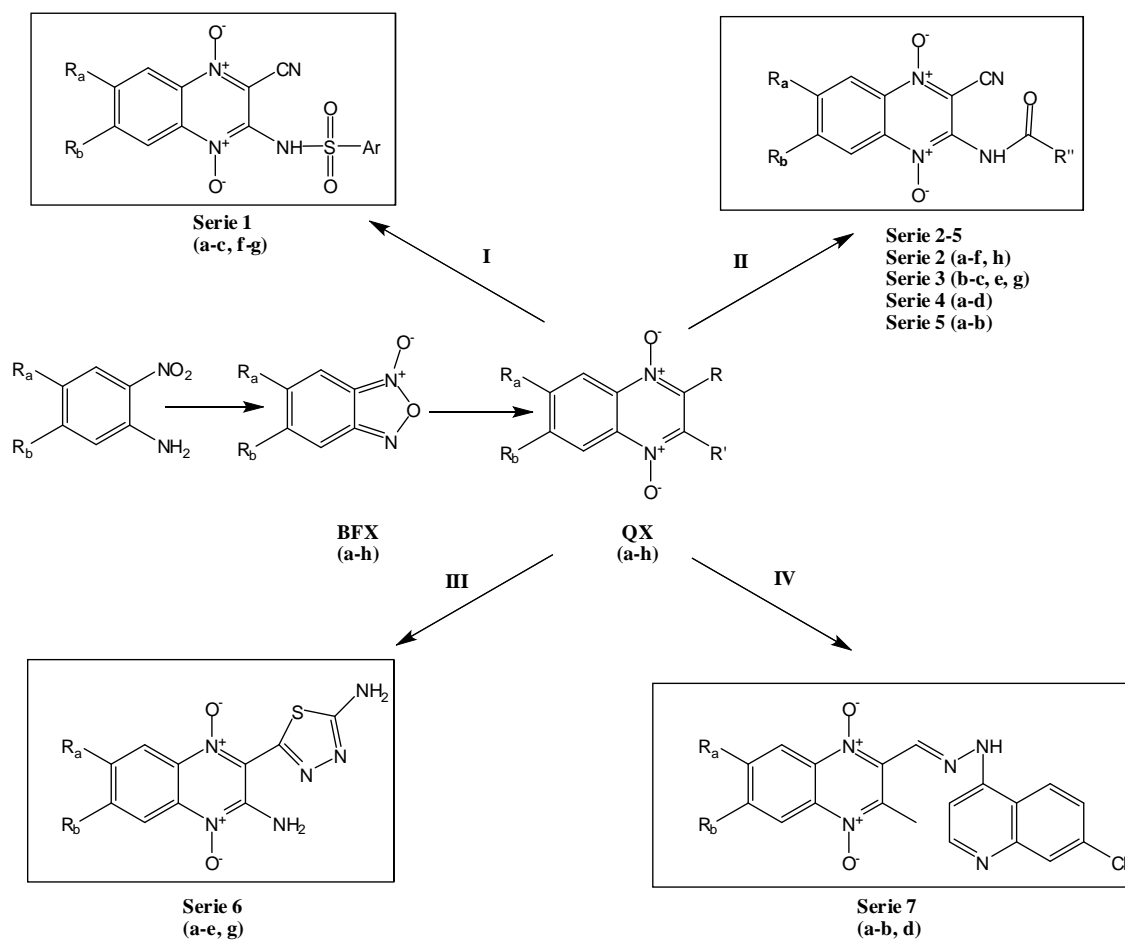


Figura 43. Esquema general de síntesis.

Condiciones y reactivos: I) cloruro de sulfonilo correspondiente, piridina,  $0^\circ\text{C}$ , atm.  $\text{N}_2$ ; II) cloruro de carbonilo correspondiente, tetrahidrofurano seco,  $T^a$  amb.\*; III) tiosemicarbazida, bicarbonato sódico, ácido trifluoroacético, reflujo; IV) 7-cloro-4-hidrazinilquinolina, tetrahidrofurano, metabisulfito sódico,  $55^\circ\text{C}$ .

\* El método de síntesis de la serie 3, difiere del de las series 2,4 y 5, ya que tiene lugar en 2 pasos, el primero con 1,1'-carbonildiimidazol, tetrahidrofurano seco y  $T^a$  amb, y el segundo con la fenilpiperazina correspondiente, cloroformo y  $T^a$  amb.

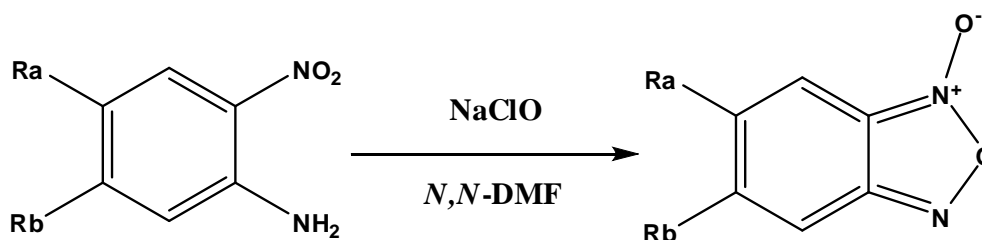
## 36. Química de los benzofuroxanos

### 36.1 Síntesis de benzofuroxanos

La síntesis de los benzofuroxanos (BFXs) presentados en este trabajo fue llevado a cabo mediante dos rutas diferentes dependiendo de los sustituyentes en posición 5 y/o 6. Los BFXs con un átomo de flúor en posición 5, con dos átomos de cloro en posiciones 5 y 6 o con dos metilos en dichas posiciones, fueron obtenidos mediante una ciclación oxidativa. El BFX con dos átomos de flúor en posiciones 5 y 6 fue sintetizado vía azida seguido por una ciclación térmica.

- *Síntesis de benzofuroxanos mediante ciclación oxidativa (compuestos e, f, g)*

Esta síntesis de BFXs consiste en una oxidación de nitroanilinas 2-sustituídas con hipoclorito sódico y *N,N*-dimetilformamida (*N,N*-DMF) como disolvente, a baja temperatura (figura 44).



**Figura 44.** Esquema de síntesis de BFXs mediante ciclación oxidativa.

Esta ciclación oxidativa parece ocurrir por un anión *N*-cloronitroanilina intermedio que descompone a un singlete nitreno intermedio y conduce a la formación instantánea del correspondiente benzofuroxano (figura 45). Este paso puede ser reconocido por la generación transitoria de un color rojo-púrpura que se observa durante la oxidación del hipoclorito.<sup>148,149</sup>

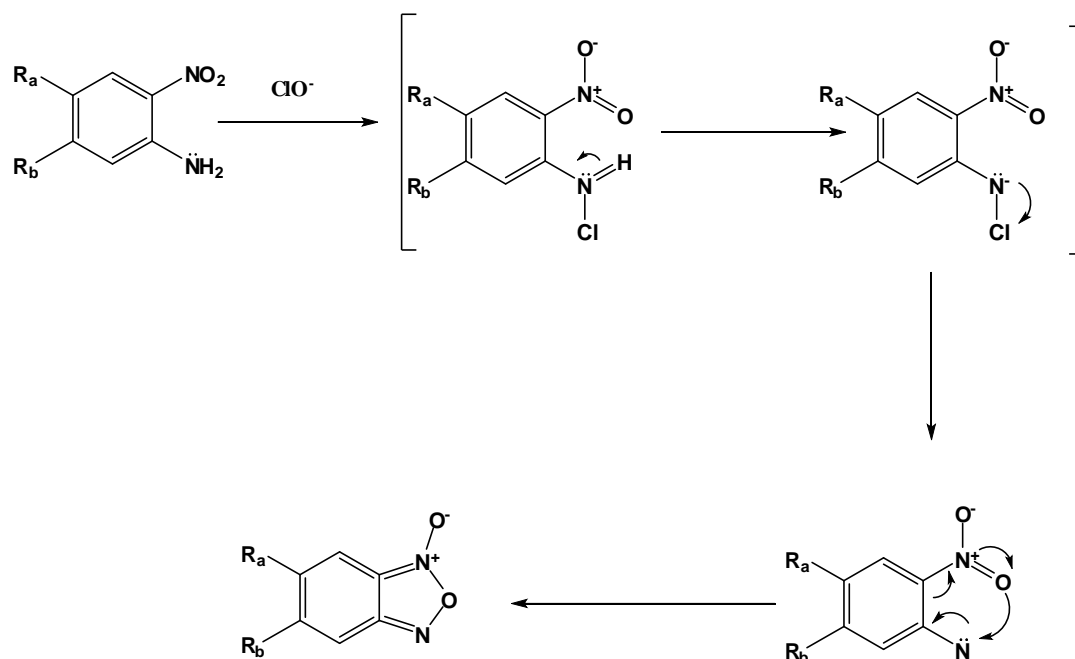


Figura 45. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de BFXs a través de ciclación oxidativa.

Este método es recomendable cuando la pirólisis de la nitroazida falla, además de ser una reacción más simple y rápida que la otra vía. Sin embargo, las condiciones de oxidación a veces destruyen el producto, como ocurre en el caso del 5,6-difluorobenzofuroxano cuya reacción debe llevarse a cabo mediante la pirólisis de la azida.

- Síntesis de benzofuroxanos vía azidas (compuesto h)

La pirólisis de *o*-nitrofenilazidas es el método más común para la síntesis de BFXs.<sup>149-151</sup> En este caso, el BFX que presenta un resto difluoro ha sido preparado según el siguiente esquema (figura 46):

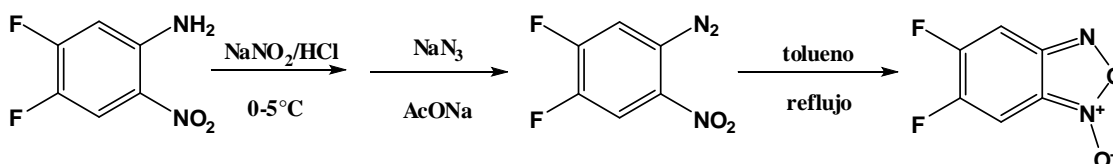


Figura 46. Esquema de síntesis del 5,6-difluorobenzofuroxano.

El primer paso consiste en la síntesis de la sal de aril diazonio, que debe desarrollarse a baja temperatura debido a la baja estabilidad de los iones diazonio en solución. La sal de diazonio es preparada por reacción de la anilina con ácido nítrico, que es generada *in situ* del nitrito sódico. Los siguientes pasos son la formación del ión nitrosonio ( $\text{NO}^+$ ) y la adición del ión al grupo amino, seguido por la eliminación de agua (figura 47).<sup>152</sup>

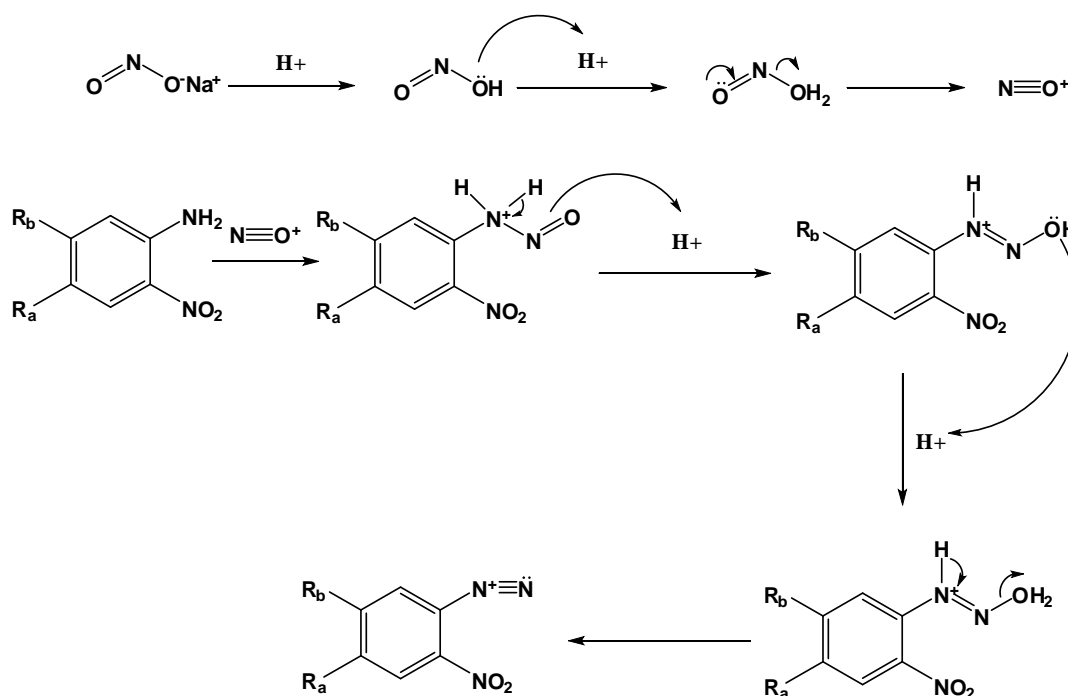


Figura 47. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de la sal de diazonio.

La sustitución de la sal de diazonio puede seguir diferentes mecanismos, aunque el más probable es que la sal de diazonio reaccione con la azida sódica dando lugar a un aducto que se descompone en nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) y la correspondiente fenilazida (figura 48).<sup>152</sup>

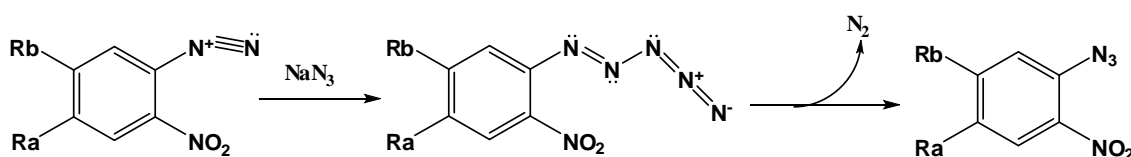
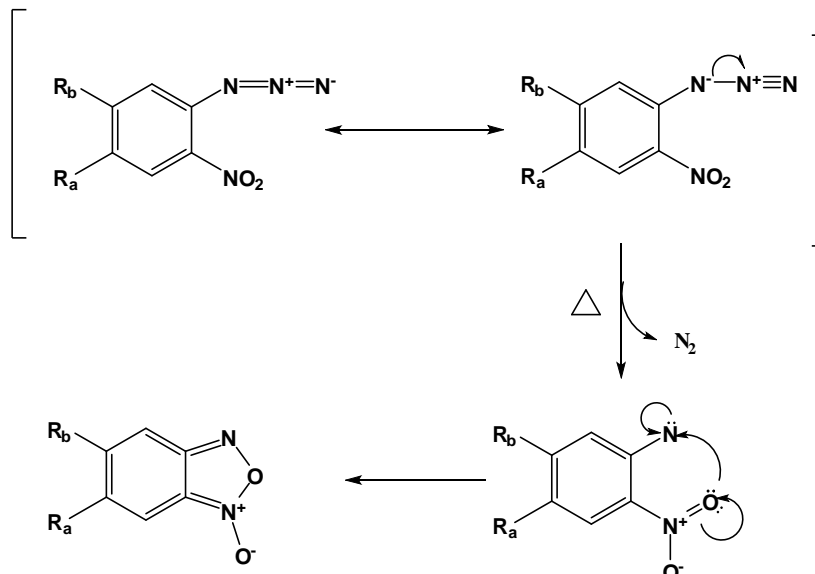


Figura 48. Mecanismo de reacción de la formación de la azida.

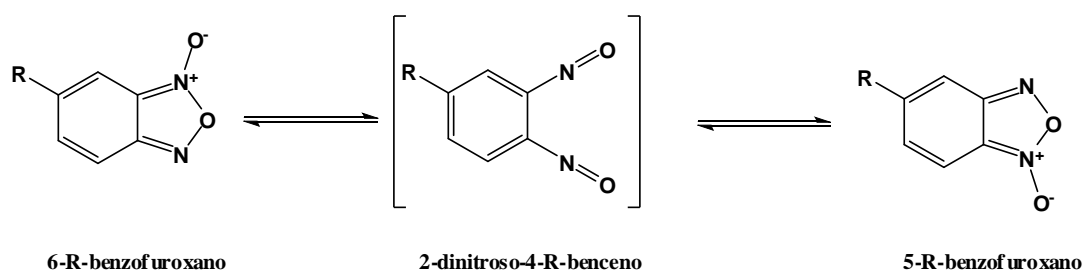
Finalmente, la ciclación parece ocurrir a través de un singlete nitreno intermedio generado por la pirólisis de la azida. El grupo nitro ataca al nitreno, que es una especie electrón deficiente, conduciendo la siguiente reorganización electrónica al BFX (figura 49).<sup>150</sup>



**Figura 49.** Mecanismo de reacción propuesto para la pirólisis de la 2-nitrofenilazida y formación del BFX.

### 36.2 Posición de los isómeros de benzofuroxanos 5(6)-monosustituidos

La interconversión de dos benzofuroxanos isoméricos en solución es uno de los rasgos más importantes y característicos de la química de estos compuestos. El tautomerismo de BFXs ha sido publicado en varios artículos y este proceso ha sido estudiado por métodos de RMN multinuclear que han conducido a la conclusión de que este proceso de isomerización ocurre mediante un intermedio *orto*-dinitrosobenceno (figura 50).<sup>149-151, 153-155</sup>



**Figura 50.** Equilibrio de benzofuroxanos 5(6)-monosustituidos.

Está claro que las constantes de equilibrio para la isomerización de los BFXs se determinan por una combinación de factores dependientes del sustituyente y de la forma en que son capaces de interactuar con las dos posiciones del anillo heterocíclico. En comparación con los compuestos con sustituyentes directamente unidos al anillo de furoxano, el equilibrio de los BFXs 5(6)-sustituídos deberían estar sujetos a efectos electrónicos atenuados y no ser considerados los efectos estéricos. En estos compuestos cuando el sustituyente es un grupo aceptor de electrones (como los sustituyentes nitro, carboxi, trifluorometil o ciano), el isómero 6-sustituído es más estable. En cambio los sustituyentes halogenuro, metoxi, acetoxi y metil, tienen una pequeña preferencia por la posición 5 del benzofuroxano.<sup>149,156</sup>

### 37. Química de los derivados de quinoxalina di-*N*-óxido

#### 37.1 Síntesis de derivados de quinoxalina di-*N*-óxido. La reacción de Beirut

Antes de 1965, la síntesis de quinoxalinas di-*N*-óxido se llevaba a cabo por la ciclación de un precursor apropiado o por oxidación directa de una quinoxalina. Estos métodos sufrieron muchos inconvenientes y la síntesis de estos derivados fue sustituida por una condensación en una sola etapa entre benzofuroxanos y enaminas que daban como resultado la correspondiente quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (figura 51).<sup>157</sup> Esta reacción fue descubierta por Haddadin e Issidorides en 1965 y es conocida como reacción de Beirut en agradecimiento a la ciudad donde fue descubierta.<sup>149,152,157,158</sup>

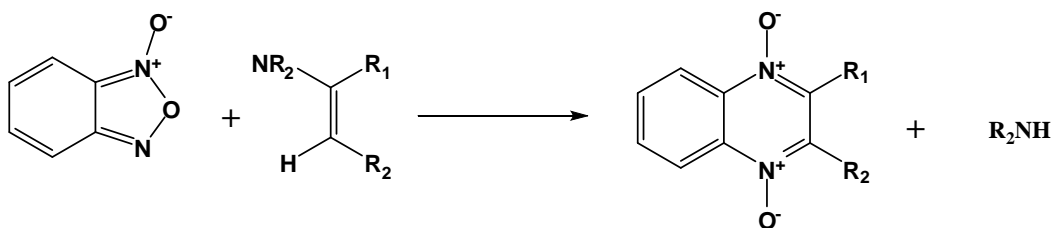


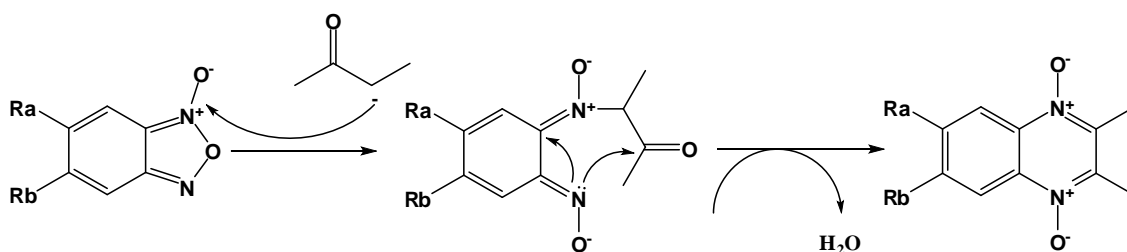
Figura 51. Reacción de Beirut.

Se ha descubierto que los BFXs pueden también reaccionar con cetonas y aldehídos en presencia de amoníaco o aminas secundarias formando *in situ* enaminas intermedias.<sup>159</sup> Además de la definición general, la reacción de Beirut ha sido ampliada a una condensación entre un benzofuroxano y un derivado de ácido cetocarboxílico o

similar, especialmente  $\beta$ -cetoéster y  $\beta$ -cetocarboxamida, en una reacción de base catalizada con o sin formación de la enamina intermedia correspondiente.<sup>160,161</sup>

Entre estas variaciones, la condensación entre BFX y malononitrilo ha sido de vital importancia para obtener los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina, que han actuado de intermedios en las **series 1-6**. Dichos intermedios se han obtenido al reaccionar el correspondiente BFX con malononitrilo utilizando *N,N*-dimetilformamida (*N,N*-DMF) como disolvente y trietilamina como base catalítica de la condensación.<sup>162</sup> En relación al mecanismo de reacción, la trietilamina capta un protón del metileno o malononitrilo activado, dando lugar a un carbanión que realiza un ataque nucleofílico sobre uno de los átomos de nitrógeno del intermedio *o*-dinitroso. Después de una reorganización electrónica, el par solitario de electrones en el átomo de nitrógeno neutro produce un ataque nucleofílico sobre uno de los grupos ciano, forzando al anillo a cerrarse y al grupo ciano a aceptar el primer protón. Luego, el catalizador elimina el protón restante en posición 2/3 del anillo de quinoxalina, alcanzándose el compuesto final después de otra reorganización electrónica (figura 54).

Sin embargo, los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina que serán los intermedios de reacción de la **serie 7**, se obtienen en dos pasos. En el primero paso, la trietilamina (base utilizada como catalizador) arranca un protón ( $H^+$ ) de la butanona. El carbanión generado produce un ataque nucleofílico en el nitrógeno con carga positiva del BFX, seguido de un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo de la butanona debido a la presencia de un nitrógeno nucleofílico en la estructura intermedia. Posteriormente, se produce una reorganización electrónica y se pierde una molécula de agua que da lugar a la formación del anillo de la 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina (figura 52).



**Figura 52.** Mecanismo de reacción del primer paso para la síntesis de los intermedios de la serie 7.

El segundo paso para obtener los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina de la serie 7, consiste en la transformación del grupo metilo en posición 2 del doble anillo en un grupo aldehído a través de la formación de un alcohol primario (figura 53).

El principal problema de esta reacción de oxidación reside en controlar que el aldehído no llegue a oxidarse hasta ácido carboxílico, por ello se utiliza  $\text{SeO}_2$  como agente oxidante ya que tiene dicha capacidad. La oxidación del metilo a alcohol se produce a través de una reacción periciclística, produciéndose primero una activación del enlace C-H y después una reacción sigmatrópica. Después el alcohol reacciona con el dióxido de selenio para formar ésteres de dialquil selenitos, que se descomponen con el calor para dar el aldehído deseado, agua y selenio libre, terminando la reacción cuando el  $\text{SeO}_2$  se ha consumido completamente.<sup>163</sup>

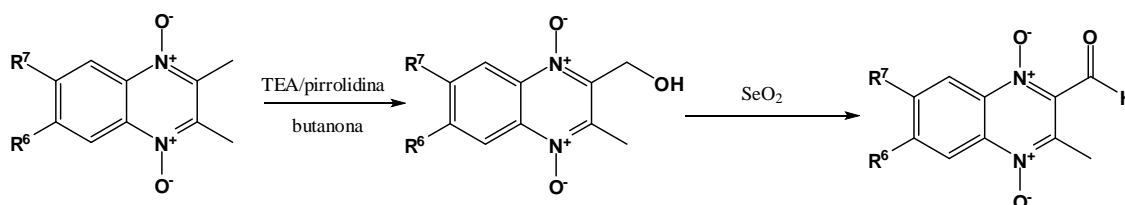


Figura 53. Mecanismo de reacción del segundo paso para la síntesis de los intermedios de la serie 7.

### 3.7.2 Posición de los isómeros de quinoxalinas 6(7)-monosustituidas

La existencia de isómeros de posición es observada también en el caso de sustituciones asimétricas en derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina (figura 54). Cuando la condensación de Beirut se lleva a cabo usando BFXs monosustituidos, se obtiene una mezcla de isómeros de posición de la correspondiente quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido. Sin embargo, el grado de regioespecificidad de la reacción depende de la naturaleza del sustituyente. Se ha observado que solo se obtiene uno de los posibles isómeros cuando el grupo metoxi es sustituido en el anillo de quinoxalina, mientras que en los casos de halógenos, metil y trifluorometil se obtiene una mezcla de isómeros. La proporción de cada isómero en la mezcla está relacionada con la naturaleza del sustituyente en la molécula y con el método sintético empleado, aún así, de acuerdo con estudios previos, en todos los casos el isómero más abundante es el que tiene el sustituyente en posición 7.<sup>115,155,164</sup>



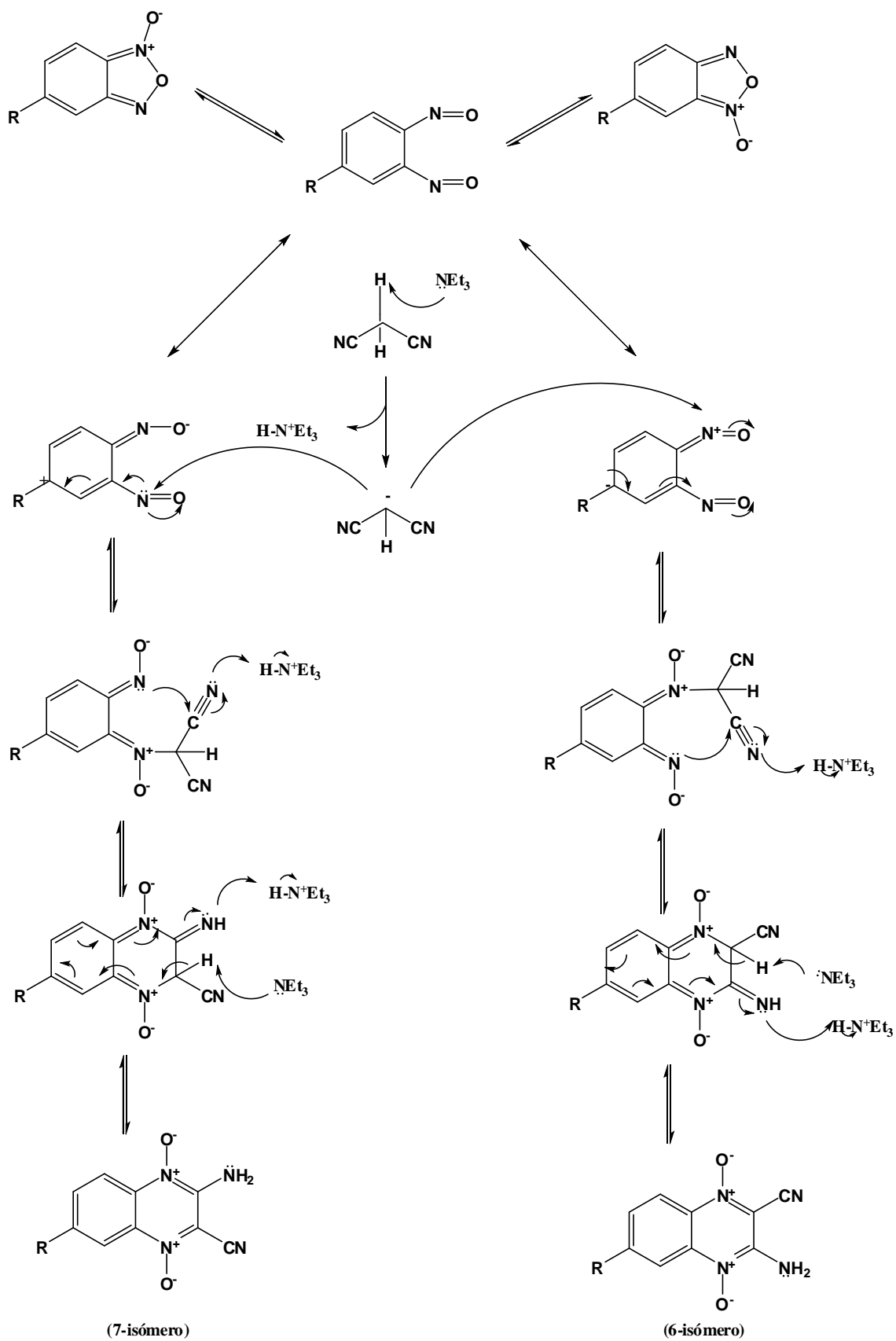


Figura 54. Mecanismo de condensación de BFXs monosustituidos con malononitrilo.

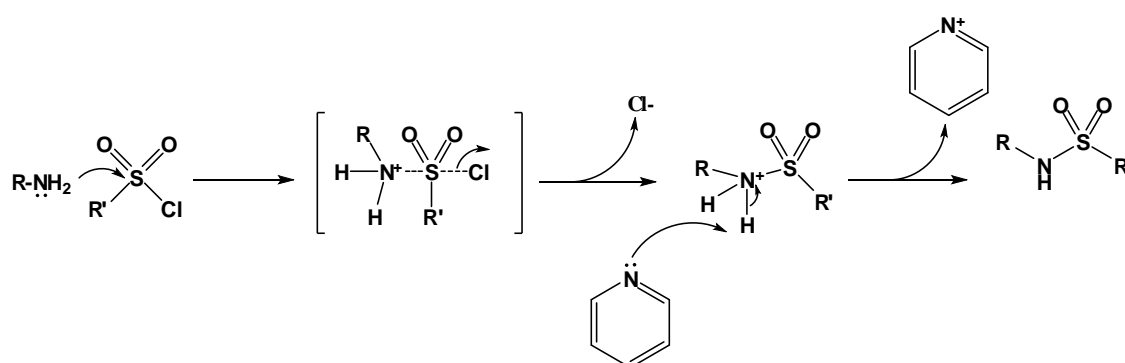
### 38. Química de los compuestos finales (series 1-7)

#### 38.1 Formación de amidas y sulfonamidas (series 1-2, 4-5)

En esta reacción, las correspondientes aminas primarias (derivados de la 3-amino-2-carbonitrilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido), son tratadas con el correspondiente cloruro de sulfonilo (**serie 1**) o cloruro de carbonilo (**series 2, 4 y 5**) para obtener los compuestos finales de dichas series.

Debido a la baja reactividad en la síntesis de los compuestos de las series 2, 4 y 5 con el disolvente empleado inicialmente (tetrahidrofurano comercial), se tomó en cuenta la posibilidad de que trazas de agua contenidos en el disolvente podían influir en la reacción. Por ello, se procedió a la deshidratación del disolvente con un tratamiento de 7 días con hidróxido potásico, y otros 7 días con hilos de sodio. Tras este tratamiento, la reacción llevada a cabo con tetrahidrofurano seco aumentó considerablemente el rendimiento y redujo a la mitad el tiempo de reacción (de 4 horas a 2).

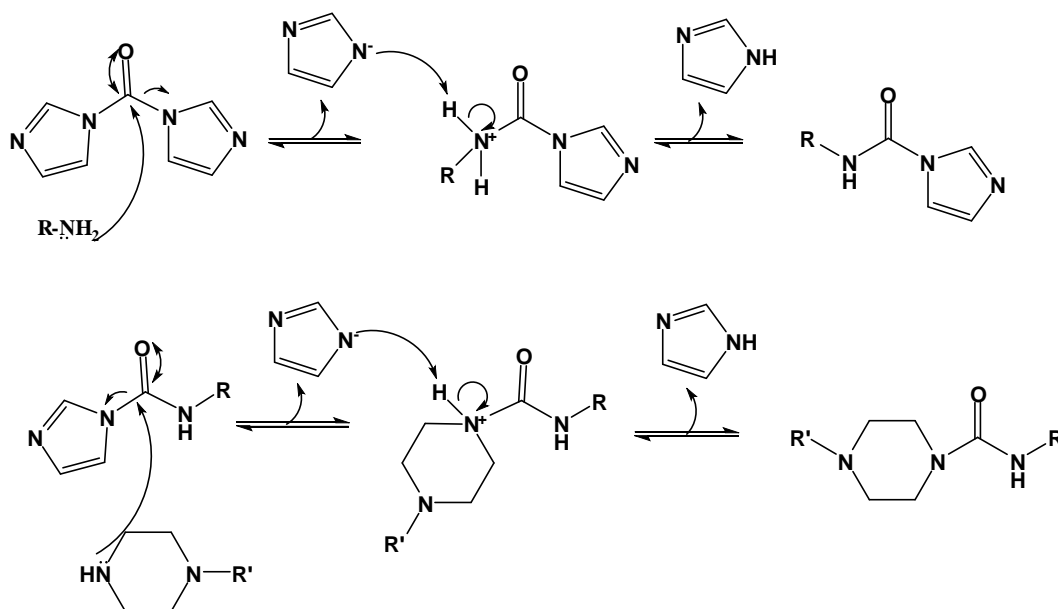
Las sustituciones nucleofílicas con cloruros de sulfonilo ( $\text{RSO}_2\text{Cl}$ ) son esencialmente las mismas que tienen lugar con cloruros de carbonilo ( $\text{RCOCl}$ ). La principal diferencia reside en que el intermedio tetraédrico formado en reacciones tradicionales  $\text{S}_{\text{N}}2$  se disponen, en el caso de los cloruros de sulfonilo, como un intermedio con geometría molecular bipiramidal trigonal con cinco grupos distribuidos alrededor del núcleo central (figura 55).<sup>165</sup>



**Figura 55.** Mecanismo propuesto de sustitución nucleofílica de cloruros de sulfonilo con aminas.

### 38.2 Doble *N*-acilación de aminas (serie 3)

Para la síntesis de los compuestos de la **serie 3**, se requieren dos etapas de reacción (acilaciones). En estos casos, el 1,1'-carbonildiimidazol actúa tanto como reactivo como catalizador, como se puede observar en la figura 56.<sup>166</sup>

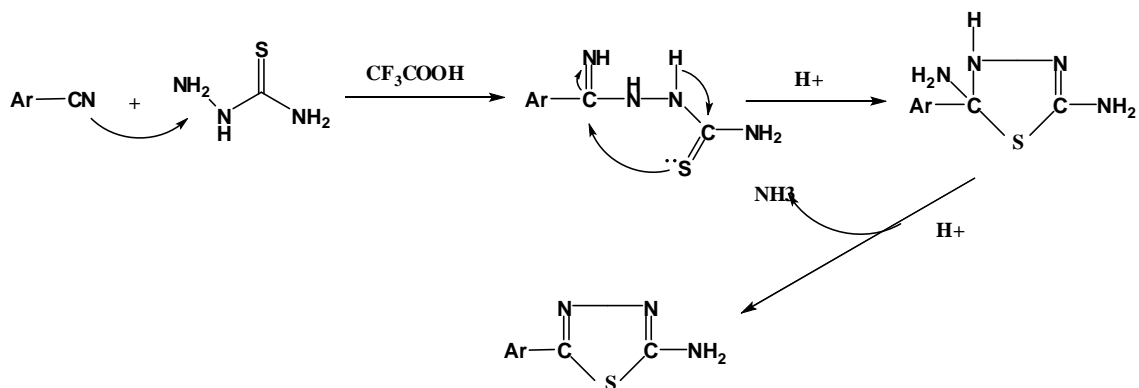


**Figura 56.** Mecanismo propuesto para la doble *N*-acilación de aminas con 1,1'-carbonildiimidazol.

### 38.3 Condensación y ciclación de tiosemicarbazida con los intermedios de reacción (serie 6)

Los compuestos finales de la **serie 6** se obtienen como resultado de una condensación de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina con tiosemicarbazida en presencia de ácido trifluoroacético, produciéndose una ciclación con liberación de amoníaco.<sup>167</sup>

La reacción se inicia con el ataque nucleofílico del azufre sobre el carbono del grupo carbonitrilo, y como resultado se produce la liberación de amoníaco y la obtención del correspondiente tiodiazol (figura 57).<sup>168</sup>



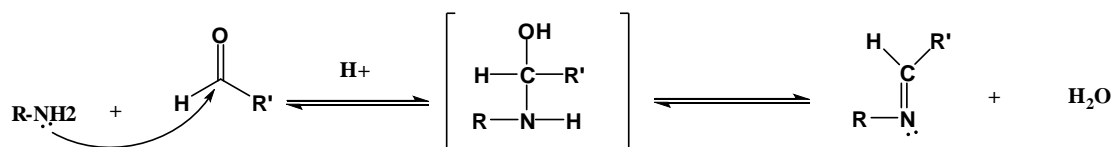
**Figura 57.** Mecanismo de condensación y ciclación de la tiosemicarbazida con los intermedios de reacción.

### 38.4 Formación de iminas (serie 7)

En condiciones adecuadas, una amina primaria reacciona con un aldehído para formar una imina. Las iminas son análogos nitrogenados de las cetonas y aldehídos, con un doble enlace carbono-nitrógeno en lugar del grupo carbonilo. La formación de una imina es un ejemplo de condensación con pérdida de agua, en este caso.

El mecanismo de formación de iminas comienza con la adición de un nucleófilo básico de la amina al grupo carbonilo, el ataque de la amina, seguido de la protonación del átomo de oxígeno y desprotonación del átomo de nitrógeno, da lugar a un intermedio inestable denominado carbinolamina.

La carbinolamina se transforma en imina mediante la pérdida de agua y la formación de un doble enlace: deshidratación. La protonación del grupo hidroxilo lo transforma en un grupo saliente (agua) y la pérdida del protón da lugar a la imina (figura 58).<sup>169</sup>



**Figura 58.** Mecanismo de la formación de iminas de la serie 7.

# **IX. QUÍMICA EXPERIMENTAL**



## 39. Material y reactivos

### *Reactivos*

Todos los reactivos y disolventes han sido adquiridos de fuentes comerciales. E. Merck (Darmstadt, Alemania), Panreac Química S. A. (Montcada i Reixac, Barcelona), Sigma-Aldrich Química S. A. (Alcobendas, Madrid), Acros Organics (Janssen Pharmaceuticaaan 3<sup>a</sup>, 2440 Geel, Bélgica) y Lancaster (Bischheim-Strasbourg, Francia).

### *Espectroscopía infrarroja (IR)*

El espectro de infrarrojo ha sido llevado a cabo en un Thermo Nicolet FTIR Nexus Euro (Madison, USA) con software OMNIC 6.0 utilizando pastillas de KBr para muestras sólidas y pastillas de NaCl para muestras líquidas. Las frecuencias están expresadas en  $\text{cm}^{-1}$ . Las intensidades de las señales se expresan como d (débil), media (m) y fuerte (f).

### *Resonancia magnética nuclear (RMN)*

El espectro de RMN ha sido realizado en un Bruker 400 Ultrashield<sup>TM</sup> (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemania), usando TMS (tetrametilsilano) como estándar interno y con DMSO- $d_6$  como disolvente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y los valores de la constante de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en hercios (Hz). Las multiplicidades de señal son representadas por: s (singlete), sa (singlete ancho), d (doblete), dd (doble doblete), ddd (doble doble doblete), t (triplete) y m (multiplete).

### *Microanálisis elemental (C, H, N)*

El microanálisis elemental se ha llevado a cabo en un Elemental Analyzer LECO CHN-900 (Michigan, USA) de muestras secadas a vacío. Los resultados analíticos para C, H y N están dentro de  $\pm 0,5$  de los valores teóricos, indicando una pureza de más del 95%.

### ***Cromatografía en capa fina (CCF)***

Para realizar la CCF se ha utilizado Alugram<sup>®</sup> SIL G/UV254 (Layer 0,2 mm) (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG. Postfach 101352. D-52313 Düren, Alemania). Las placas han sido estudiadas bajo ultravioleta con una longitud de onda entre 254 y 365 nm. Se han empleado varias fases móviles como eluyentes (tolueno/dioxano, diclorometano/metanol, acetato).

### ***Cromatografía en columna***

La purificación por cromatografía en columna se ha desarrollado utilizando columnas de cristal y Silica gel 60 (0,040-0,063 mm) (Merck) como fase estacionaria. Se han empleado varias fases móviles como eluyentes, destacando en este caso tolueno/dioxano (6:4), diclorometano/metanol (9:1) y acetato.

### ***Punto de fusión***

Los puntos de fusión han sido determinados por un aparato Mettler FP82+FP80 (Greifense, Suiza). Los puntos de fusión son expresados en grados centígrados (°C).



## 40. Métodos generales de síntesis

Con la finalidad de facilitar la lectura y comprensión de la descripción de los compuestos sintetizados, se asignan los códigos correspondientes a las posiciones 5 y 6 de los benzofuroxanos, y a los sustituyentes en posiciones 6 y 7 de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina y compuestos finales.

### 40.1 Método A. Métodos generales de síntesis de benzofuroxanos

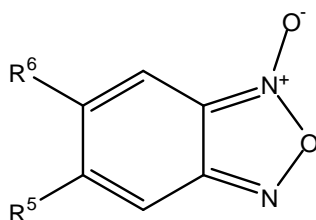


Tabla 4.

Compuesto	R <sup>6</sup> /R <sup>5</sup>
a	H/H
b	Cl/H
c	CH <sub>3</sub> /H
d	CH <sub>3</sub> O/H
e	F/H
f	CH <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub>
g	Cl/Cl
h	F/F

Se han empleado ocho benzofuroxanos (BFXs) en la síntesis de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina. Los BFXs **a**, **b**, **c** y **d**, están disponibles comercialmente, mientras que para los demás, se han seguido dos rutas de síntesis en función de los sustituyentes en las posiciones 5 y 6.

#### Método A1. Método de síntesis de los benzofuroxanos (e, f, g)

Se disuelve la correspondiente 2-nitroanilina comercial (20 mmoles) en 75 mL de *N,N*-dimetilformamida y se enfría en baño de hielo hasta alcanzar 0°C. A continuación, se añaden lentamente 500-700 mL (dependiendo de los sustituyentes) de una solución de hipoclorito sódico 10% v/v y se deja agitando durante 15 minutos en baño de hielo. Por último, el precipitado es filtrado y lavado con agua fría.

Este método es utilizado para sintetizar los BFXs **e**, **f** y **g** que serán usados sin mayor purificación.

## Método A2. Método de síntesis del benzofuroxano (h)

La síntesis del benzofuroxano **h** se realiza en 4 pasos (figura 59):

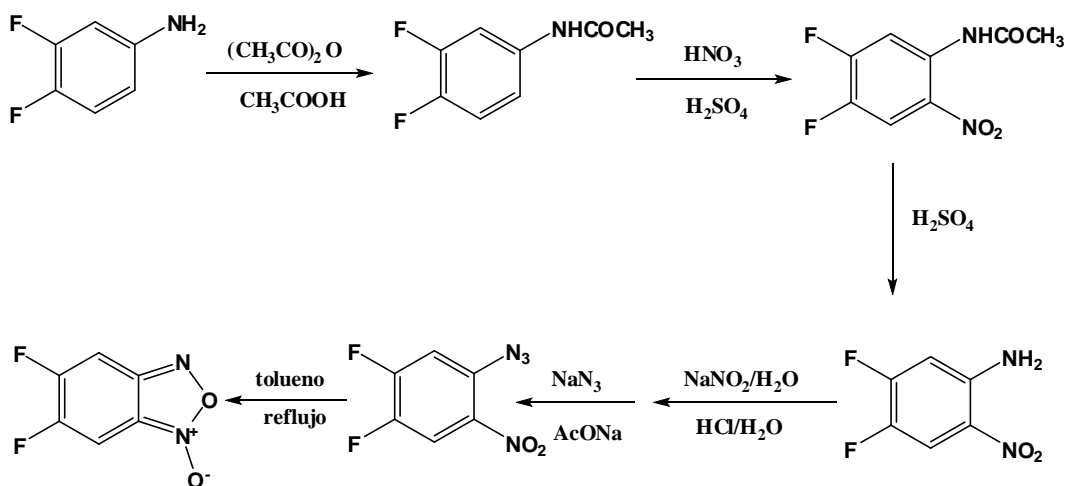


Figura 59. Esquema de síntesis del 5,6-difluorobenzofuroxano.

### 1- Protección de la anilina

Se disuelve la 3,4-difluoroanilina comercial (116 mmoles) en una mezcla de 24 mL de ácido acético y 24 mL de anhídrido acético, y se lleva a reflujo durante 15 minutos. Una vez enfriado, se vierte el contenido sobre 500 mL de agua fría, se filtra el precipitado y se lava con agua fría.

### 2- Nitración

Una vez secado bien el producto obtenido anteriormente, se añaden lentamente 75 mmoles del mismo sobre una mezcla fría de 25,4 mL de ácido nítrico 60% v/v y 25,4 mL de ácido sulfúrico 96% v/v, y se deja en agitación 15 minutos en frío y 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se vierte sobre 500 mL de agua fría donde se forma un precipitado que se filtra y se lava con abundante agua.

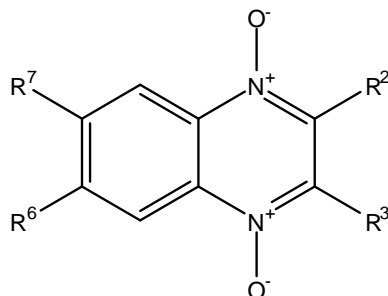
### 3- Hidrólisis ácida

Una vez secado bien el producto obtenido anteriormente, se añade lentamente sobre 49,74 mL de ácido sulfúrico 96% v/v, y se lleva a reflujo durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se vierte sobre 500 mL de agua fría, se filtra el precipitado y se lava con abundante agua fría.

### 4- Formación de la azida

Se añaden 25,86 mmoles del producto obtenido en la reacción anterior, sobre una mezcla de 31,05 mL de ácido clorhídrico 37% v/v y 95 mL de agua, y se enfría hasta alcanzar los 0-5°C. A continuación se añaden 46,37 mmoles de nitrito sódico diluidos en 15,93 mL de agua, y la mezcla se filtra sobre una mezcla fría y en agitación de 239 mL de agua, 0,7 moles de acetato sódico y 61,23 mmoles de azida sódica. Posteriormente, se realiza una extracción con diclorometano, se recoge la fase orgánica y se elimina el disolvente a presión reducida, se diluye con 50 mL de tolueno y se vierte sobre una solución caliente de 230 mL de tolueno, llevándose a reflujo durante 3 horas. Por último, se elimina el disolvente a presión reducida y el aceite resultante se purifica con cromatografía en columna utilizando diclorometano como fase móvil.

**40.2 Método B. Métodos de síntesis de los derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina**

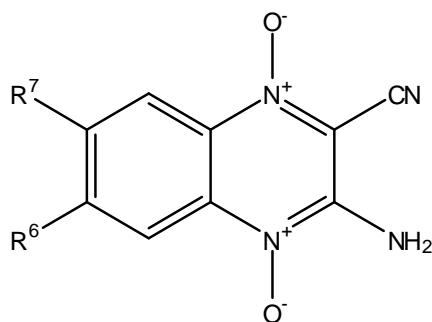


Se han empleado varios derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina para la síntesis de los compuestos finales, en función de los sustituyentes en las posiciones 2 y 3 mediante dos vías de síntesis distintas **B1** (series 1-6) y **B2** (serie 7).

**Tabla 5.**

Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>
a	H/H
b	Cl/H
c	CH <sub>3</sub> /H
d	CH <sub>3</sub> O/H
e	F/H
f	CH <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub>
g	Cl/Cl
h	F/F

**Método B1. Método de síntesis de los derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina correspondientes a las series 1-6**



**Tabla 6.**

R <sup>3</sup>	R <sup>2</sup>
NH <sub>2</sub>	CN

Se disuelven 13 mmoles del correspondiente benzofuroxano y 20 mmoles de malononitrilo en 50 mL de *N,N*-dimetilformamida, y se enfría la mezcla hasta alcanzar 0°C. A continuación, se añaden lentamente 0,9 mL de trietilamina y se deja agitando la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas. Posteriormente, se añade una mezcla de éter etílico y metanol sobre la reacción y se filtra, obteniéndose el compuesto que será utilizado sin mayor purificación.

**Método B2. Método de síntesis de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina correspondientes a la serie 7**

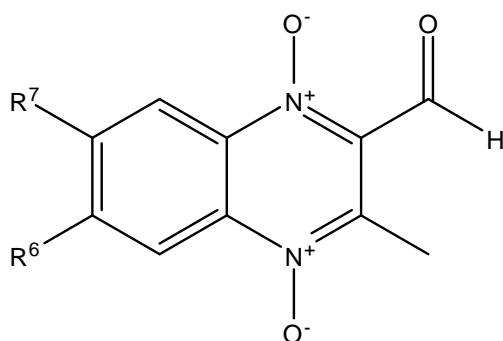


Tabla 7.

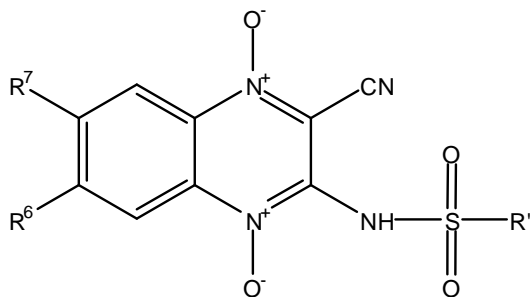
R <sup>3</sup>	R <sup>2</sup>
CH <sub>3</sub>	CHO

La síntesis de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina correspondientes a la **serie 7** se lleva a cabo en 2 pasos:

- 1- Se disuelven 12 mmoles del benzofuroxano correspondiente en 1-5 mL de trietilamina (dependiendo del BFX empleado) y se enfría en baño de hielo hasta alcanzar 0°C. A continuación se añaden lentamente 1,5 mL de pirrolidina, y posteriormente 15 mmoles de butanona. Se deja agitar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente, se filtra y se lava con etanol frío.
- 2- Se disuelven 4 mmoles del compuesto obtenido anteriormente y 4 mmoles de dióxido de selenio en 20 mL de acetato de etilo en un tubo de microondas, y se agita a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación la mezcla se

somete a radiación de microondas a 80 W y 75°C durante 25 minutos, el disolvente se elimina a presión reducida, el compuesto es extraído con cloroformo caliente y se filtra. Por último, el cloroformo se elimina a presión reducida, y el sólido se filtra y lava con éter etílico.

#### 40.3 Método C. Método de síntesis de los compuestos de la serie 1



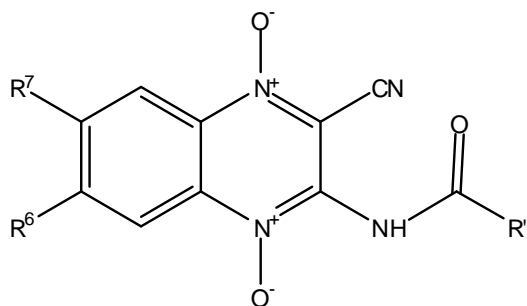
Se disuelven 5 mmoles del correspondiente derivado del 3-amino-2-carbonitrilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido sobre 16 mL de piridina en baño de hielo, y sobre la mezcla se añaden lentamente 7,5 mmoles del correspondiente cloruro de sulfonilo en 12 mL de piridina. La mezcla se deja agitando 2 horas a 0°C en atmósfera de nitrógeno, y transcurrido ese tiempo se deja que alcance temperatura ambiente.

Tabla 8.

R'	Compuestos
	1.1
	1.2
	1.3

A continuación, se añaden 100 mL de agua y se filtra el precipitado formado. Una vez seco, se purifica por cromatografía en columna utilizando como fase móvil acetato de etilo.

40.4 Método D. Método de síntesis de los compuestos de las series 2, 4 y 5

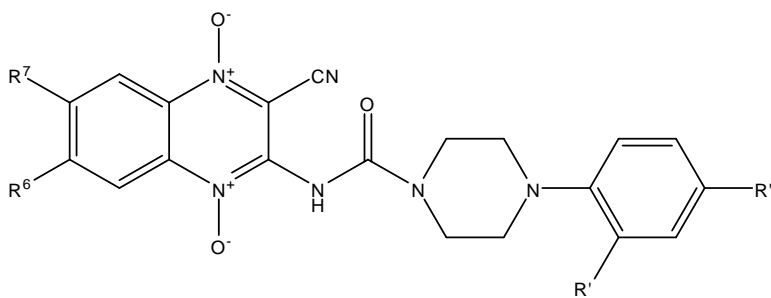


Se disuelven 5 mmoles del correspondiente derivado del 3-amino-2-carbonitrilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido sobre 20 mL de tetrahidrofurano seco, y a continuación, se añade un exceso del correspondiente cloruro de carbonilo en una proporción (1:1,2) con respecto al derivado de quinoxalina. Se deja en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, se filtra y se purifica por cromatografía en columna utilizando como fase móvil tolueno/dioxano (6:4) o diclorometano/metanol (97:3).

Tabla 9.

R'	Compuestos
	2
	4.1
	4.2
	4.3
CH <sub>3</sub>	5.1
CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	5.2
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> Cl	5.3

**40.5 Método E. Método de síntesis de los compuestos de la serie 3**



**Tabla 10.**

R'/R''	Compuestos
NO <sub>2</sub> /CF <sub>3</sub>	<b>3.1</b>
H/CF <sub>3</sub>	<b>3.2</b>
H/F	<b>3.3</b>
H/CH <sub>3</sub> O	<b>3.4</b>

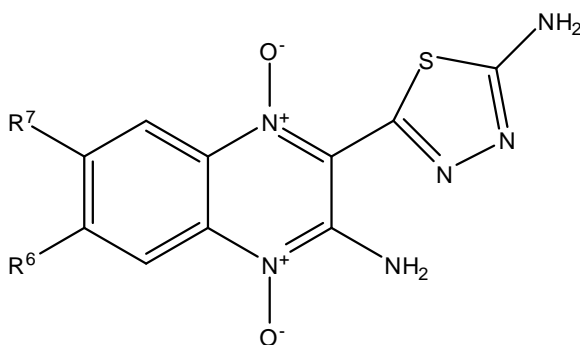
La síntesis de los compuestos finales de la **serie 3**, se realiza en dos pasos.

- 1- Se disuelven 3 mmoles del correspondiente derivado del 3-amino-2-carbonitrilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido en 20 mL de tetrahidrofurano seco, y a continuación se añaden 4 mmoles de 1,1'-carbonildiimidazol, y se deja en agitación a una temperatura de 50°C durante 3 horas.

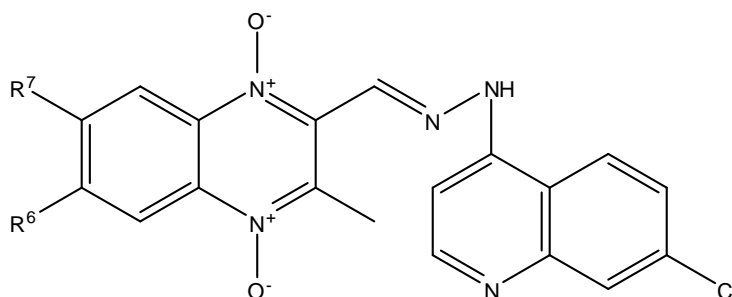
Por último, se elimina el disolvente a presión reducida, se filtra el precipitado formado al añadir éter etílico, y una vez seco, se purifica por cromatografía en columna utilizando como fase móvil tolueno/dioxano (6:4).

- 2- Se disuelve el compuesto resultante en la etapa anterior en 20 mL de cloroformo, y se añade un exceso de la correspondiente fenilpiperazina (1:1,2). Se deja en agitación durante 3 horas a una temperatura de 50°C bajo atmósfera de nitrógeno, y a continuación se elimina el disolvente a presión reducida, se filtra el precipitado formado al añadir éter etílico, y una vez seco, se purifica por cromatografía en columna utilizando como fase móvil diclorometano/metanol (99:1).



**40.6 Método F. Método de síntesis de los compuestos de la serie 6**

Se añaden 20 mmoles del correspondiente derivado del 3-amino-2-carbonitrilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido y 22 mmoles de tiosemicarbazida sobre 20 mL de ácido trifluoroacético. Se lleva la mezcla a reflujo durante 7 horas y se vierte el contenido sobre 20 mL de agua fría. A continuación, se neutraliza la mezcla con una lenta adición de una solución saturada de bicarbonato sódico (30 mL), y el precipitado se filtra. Por último, se purifica el compuesto por cromatografía en columna utilizando como fase móvil tolueno/dioxano (1:1).

**40.7 Método G. Método de síntesis de los compuestos de la serie 7**

Se disuelve 1 mmol del correspondiente derivado del 2-formil-3-metilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido y 1 mmol de la 7-cloro-4-hidrazinilquinolina comercial en 20 mL de tetrahidrofurano en un tubo de microondas. A continuación se añaden 0,4 mmoles de disulfito sódico y la mezcla se somete a radiación de microondas a 80 W y 55°C durante 1 hora. La mezcla se enfría en baño de hielo, se añade éter etílico y se filtra el

precipitado obtenido. Una vez seco, se procede a su purificación por cromatografía en columna utilizando como fase móvil tolueno/dioxano (6:4).

En el caso del **compuesto 7a**, se ha obtenido el compuesto clorohidratado. Para ello, el compuesto obtenido anteriormente, se disuelve en éter etílico y se deja en agitación, se añaden 5-6 gotas de éter saturado de clorhídrico y a los 2-3 minutos, se filtra y se lava con éter etílico.

# **X. ENSAYOS BIOLÓGICOS**



#### 41. Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro*

La mayoría de los compuestos descritos han sido ensayados por el Grupo Malaria, de la Universidad de Antioquía, en Medellín (Colombia). Los compuestos **7b** y **7d**, han sido ensayados por el departamento “Diseases of the Developing World” de GlaxoSmithKline, en Tres Cantos (Madrid).

Los ensayos *in vitro* llevados a cabo por el Grupo Malaria, han sido realizados en cepas *Colombian FCR-3* de *Plasmodium falciparum*, resistentes a la CQ, mientras que los realizados por GSK, han sido realizados en cepas *3D7A* de *Plasmodium falciparum*, sensibles a CQ.

Respecto al tipo de ensayo realizado, en ambos casos ha sido el mismo: incorporación de hipoxantina tritiada. Los cultivos se desarrollaron a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y en un medio de glucosa enriquecida RPMI 1640, con gentamicina a una concentración de 0,1 mg/mL y suero humano al 10% inactivado por calor como se describe en la bibliografía.<sup>170</sup> Los compuestos se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta completar un rango de concentraciones entre 200 y 0,1 µM. La concentración final de DMSO nunca es superior al 0,1%.

La actividad antimalárica *in vitro* se mide utilizando el ensayo de incorporación de hipoxantina tritiada (MP Biomedicals, USA) según el método de Desjardins.<sup>171</sup> El método consiste en una medición indirecta de la actividad metabólica del parásito, por medio de la incorporación de un precursor de ácidos nucleicos marcado radiactivamente. El *Plasmodium* es incapaz de sintetizar las purinas que necesita para su replicación, obteniéndolas de una fuente externa. La utilización del precursor de purinas marcadas permitirá determinar la incorporación del material genético del parásito y por tanto, se comportará como marcador de la regeneración del mismo.

Los ensayos se realizan por triplicado y los resultados se obtienen por interpolación lineal.<sup>172</sup> Finalmente, se expresan como CI<sub>50</sub> (concentración que produce una inhibición del 50% del crecimiento ± la desviación estándar), según la siguiente ecuación:

$$\text{Log (CI}_{50}) = \text{log (X}_1) + (50 - Y_1) / (Y_2 - Y_1) [\text{log (X}_2) - \text{log (X}_1)]$$

siendo:  $X_1$ = concentración del compuesto que da un % de inhibición de la parasitemia  $Y_1 > 50\%$ ;  $X_2$ = concentración del compuesto que da un % de inhibición de la parasitemia  $Y_2 < 50\%$ .

El porcentaje de incorporación de hipoxantina unida al parásito se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ hipoxantina incorporada} = 100 - (P/T \times 100)$$

siendo: P= cuenta por minuto (c.p.m.) para cada concentración; T= control negativo (eritrocitos sin tratar).

## **42. Evaluación de la actividad leishmanicida *in vitro***

Los compuestos correspondientes a las **series 1 y 2**, han sido ensayados por el Grupo de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en Lima (Perú), mientras que los compuestos correspondientes a las **series 3-7**, han sido ensayados en la Universidad Paul Sabatier, en Toulouse (Francia).

Los ensayos llevados a cabo en Perú han sido realizados en cepas de *Leishmania amazonensis*, mientras que los llevados a cabo en Francia han sido realizados tanto en cepas de *Leishmania infantum* como de *Leishmania amazonensis*.

El tipo de ensayo realizado en ambos casos es el mismo. Las cepas de ambas especies son preservadas en estadio promastigote en un medio bifásico (agar sangre con 0,89% NaCl, pH=7,4) a 24°C. Los promastigotes ( $5 \times 10^6$ ) son luego transferidos a 25 cm<sup>2</sup> de frasco de cultivo tisular que contienen 5 mL de medio suplementado M199 con 10% de suero bovino fetal (FBS), a un pH de 7,4. Después de 4 días, la fase exponencial de promastigotes es centrifugada durante 10 minutos a 1500 g y 4°C. El sobrenadante se descarta y se reemplaza por un medio fresco M199 suplementado con 20% FBS, a un pH de 5,5. Los amastigotes libres transformados son luego inducidos por incremento de la temperatura a 34°C e incubando durante 96 horas.<sup>173</sup>

Se siembran macrófagos de cavidades peritoneales de ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas, en un medio congelado M199 suplementado con 10% FBS.<sup>174</sup> Las células extraídas son inmediatamente depositadas en cristales esterilizados de 4x4 mm

cubiertos y colocados en cada pocillo de una placa de 96. Las placas se dejan incubando durante 24 horas a 37°C, a 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adhesión celular. Un medio M199 completo precalentado se usa dos veces para eliminar las células no-adherentes. Aproximadamente 7x10<sup>4</sup> células viables son depositadas en cada pocillo para la adhesión.

Para estimar la concentración inhibitoria del 50% de los extractos (CI<sub>50</sub>), se utilizó el micrométodo del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromado (MTT).<sup>175</sup>

Para calcular la actividad leishmanicida intracelular en la infección de los macrófagos por los amastigotes, el medio que contiene en los pocillos los macrófagos es reemplazado por una suspensión que contiene amastigotes, usando una infección de proporción amastigotes/macrófagos (3:1). Después de la infección (24 horas), se añade al cultivo una solución del compuesto para ser testado a varias concentraciones y se mantiene en incubación a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas más. Las placas se fijan con metanol y una tinción Giemsa 10%. El porcentaje de macrófagos infectados se determina microscópicamente a 1000 aumentos, y el número de amastigotes intracelulares se determina en 300 células. El porcentaje de tasa de infección (%IR) de cada cultivo se calcula de la siguiente manera:

$$\%IR = 100 - \left( \frac{\text{tasa de infección del cultivo tratado}}{\text{tasa de infección del cultivo sin tratar}} \right) \times 100$$

La CI<sub>50</sub> se calcula también como la dosis capaz de reducir al 50% el número de células infectadas. Se repiten los experimentos por triplicado y se utiliza el test ANOVA para realizar el estudio estadístico. El número total de carga parasitaria se calcula como el número de células infectadas por amastigotes, por el número de macrófagos infectados.

### **43. Evaluación de la toxicidad en leishmaniasis**

Los compuestos correspondientes a las **series 1 y 2**, han sido ensayados por el Grupo de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en Lima (Perú), mientras que los compuestos correspondientes a las **series 3-7**, han sido ensayados en la Universidad Paul Sabatier, en Toulouse (Francia).

Los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo en Perú han determinado la toxicidad en macrófagos peritoneales de roedor, los cuales son tratados con el método de exclusión de la tinción azul tripán.<sup>176</sup> Se añaden diluciones de 10, 1 y 0,1  $\mu\text{M}$  en medio completo hasta alcanzar un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ . El cultivo se incuba durante 48 horas a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de esta incubación, se contabiliza el número de células viables utilizando un hematocitómetro con una solución de azul tripán 0,4% en PBS. Así se determina la mitad de la dosis citotóxica máxima 50 para cada tipo celular. Se repiten estos experimentos 3 veces.

Los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo en Toulouse han determinado la toxicidad en células epiteliales de riñón de mono African (Vero). Estas células fueron cultivadas con medio DMEN F-12 (Cat N° BE12-719F) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, NEAA, piruvato de sodio y mantenidas en una incubadora a 37°C con una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . La evaluación toxicológica se realiza en placa de 96 pocillos de fondo plano, adicionando 100  $\mu\text{L}$  de cultivo de células Vero a cada pocillo, a una concentración de  $10 \times 10^5$  células/pocillo. Los compuestos se añadieron a diferentes concentraciones: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y el efecto se evalúa 48 horas después de haber adicionado el compuesto.

El efecto se determinó usando el ensayo de viabilidad celular del MTT que consiste en adicionar 10  $\mu\text{L}$  de MTT a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en las placas que son colocadas nuevamente en la incubadora, cubiertas con papel aluminio durante el periodo de incubación. Cuatro horas después de finalizado el periodo de incubación, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de una solución de lisis que contiene 50% de isopropanol, 10% de SDS, y se dejan reposar las placas a temperatura ambiente en un orbital a 150 rpm durante 30 minutos.

Finalmente, se lee la densidad óptica con un escáner de 96 pocillos a 590 nm en un equipo Bio-Rad. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.



**XI. ESTUDIOS  
COMPUTACIONALES**



Se ha llevado a cabo un estudio computacional diseñado para predecir las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) de los compuestos de las **series 1 y 2** utilizando propiedades del juego de herramientas online “Molinspiration” (MolinspirationCheminformatics). Parámetros como la liposolubilidad (miLogP), el área topológica de superficie polar (TPSA) que es un buen indicador de la absorción intestinal (penetración en monocapa de la línea celular Caco-2 y de la barrera hematoencefálica)<sup>177</sup>, utilizado para calcular el porcentaje de absorción intestinal en humanos (%ABS), han sido calculados utilizando la siguiente ecuación:<sup>178</sup>

$$\%ABS = 109 - 0,345 \times TPSA$$

Además, también se han calculado el número de enlaces rotables (n-ROTB) y las reglas de Lipinski.<sup>179</sup>

El análisis de la relación estructura-actividad fue llevado a cabo utilizando “Cresset’s field technology”<sup>180</sup>, que condensa los campos moleculares representados en la figura 60 por campos alrededor de la molécula, llamados “Field Points”.<sup>181</sup>

Estos campos son proyecciones de las potenciales fuerzas intermoleculares de la molécula: electrostáticas, de van der Waals e hidrofóbicas. Mediante el software “FielView®”, los campos aparecen coloreados de la siguiente manera:

- Azul: campos negativos (que pueden interactuar con campos positivos/donadores de puentes de hidrógeno en la proteína).
- Rojo: campos positivos (que pueden interactuar con campos negativos/aceptores de puentes de hidrógeno en la proteína).
- Amarillo: campos de superficie de van der Waals (describiendo posible superficie/interacciones de vdW).
- Dorado: campos hidrofóbicos (describen regiones con alta polarizabilidad/hidrofobicidad).



# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



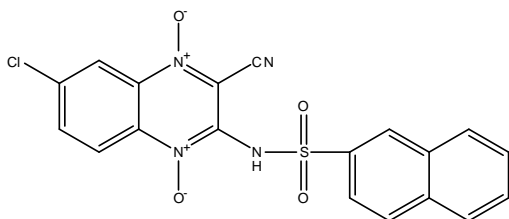
## **XII. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS**





La descripción de los cuarenta y ocho compuestos finales presentados en esta memoria incluye la siguiente información: nombre químico, referencia del compuesto, fórmula molecular, peso molecular (P.M.), punto de fusión (P.F.), apariencia, rendimiento, método sintético, método de purificación, espectroscopía infrarroja (IR), resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y análisis elemental (C, H, N).

**2-ciano-7-cloro-3-(naftaleno-2-sulfonamida)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**  
**(Compuesto 1.1b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Cl S

**P.M:** 426,6 g/mol

**P.F:** 285°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 13%

**Método de síntesis:** Método C partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando acetato de etilo como fase móvil.

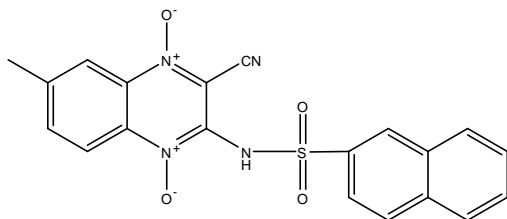
**IR (KBr),  $\nu$ :** 3396 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2222 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1378 (f,  $\nu_{\text{N+O}}$ ); 1171 (f,  $\nu_{\text{S=O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.66 (d,1H, **H**<sub>1</sub> NFT); 8.22 (d,1H, **H**<sub>8</sub> NFT,  $J_{8-7}$ = 8.4 Hz); 8.17 (d,1H, **H**<sub>4</sub> NFT,  $J_{4-3}$ = 8.7 Hz); 8.09 (d,1H, **H**<sub>7</sub> NFT,  $J_{7-8}$ = 8.3 Hz); 8.07 (d, 1H, **H**<sub>5</sub> QX,  $J_{5-8}$ = 2.3 Hz); 8.02 (d,1H, **H**<sub>5</sub> NFT,  $J_{5-7}$ = 1.9 Hz,  $J_{5-6}$ = 8.7 Hz); 7.78 (m,1H, **H**<sub>6</sub> NFT); 7.69 (m, 3H, **NH+H**<sub>6</sub> QX+**H**<sub>3</sub> NFT); 7.65 (d,1H, **H**<sub>8</sub> QX,  $J_{8-5}$ = 2.4 Hz) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Cl S):**

	Teórico	Hallado
C%	53,44	52,95
H%	2,57	2,70
N%	13,12	12,98

**2-ciano-7-metil-3-(naftaleno-2-sulfonamida)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**  
**(Compuesto 1.1c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

**P.M:** 406,1 g/mol

**P.F:** 292°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 13%

**Método de síntesis:** Método C partiendo del 5-metilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando acetato de etilo como fase móvil.

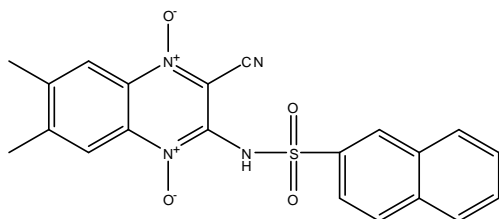
**IR (KBr),  $\nu$ :** 3412 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2222 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1369 (f,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1171 (f,  $\nu_{\text{S=O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.64 (s,1H, **H<sub>1</sub>** NFT); 8.21 (d,1H, **H<sub>8</sub>** NFT,  $J_{8-7}$ = 8.3 Hz); 8.16 (d,1H, **H<sub>4</sub>** NFT,  $J_{4-3}$ = 8.8 Hz); 8.08 (d,1H, **H<sub>7</sub>** NFT,  $J_{7-8}$ = 8.4 Hz); 8.02 (d,1H, **H<sub>5</sub>** NFT,  $J_{5-6}$ = 8.8 Hz); 7.88 (s,1H, **H<sub>8</sub>** QX); 7.77 (d,1H, **H<sub>6</sub>** QX,  $J_{6-5}$ = 7.5 Hz); 7.69 (d,1H, **H<sub>5</sub>** QX,  $J_{5-6}$ = 7.5 Hz); 7.48 (sa,2H, **H<sub>3</sub>+H<sub>6</sub>** NFT); 7.44 (s,1H, **NH**); 2.37 (s,3H, **CH<sub>3</sub>-C7** QX) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S):**

	Teórico	Hallado
C%	57,81	57,39
H%	3,37	3,27
N%	13,49	13,12

**2-ciano-6,7-dimetil-3-(naftaleno-2-sulfonamida)quinoxalina 1,4-di-N-óxido (Compuesto 1.1f)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> S

**P.M:** 420,1 g/mol

**P.F:** 292°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 13%

**Método de síntesis:** Método C partiendo del 5,6-dimetilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando acetato de etilo como fase móvil.

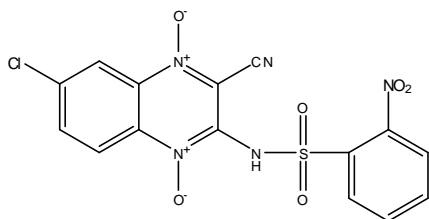
**IR (KBr),  $\nu$ :** 3324 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2226 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1372 (f,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1172 (f,  $\nu_{\text{S=O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.62 (s,1H, **H**<sub>1</sub> NFT); 8.21 (d,1H, **H**<sub>4</sub> NFT,  $J_{4-1}$ = 2.8 Hz); 8.19 (d,1H, **H**<sub>3</sub> NFT,  $J_{3-1}$ = 3.5 Hz); 8.10 (d,1H, **H**<sub>8</sub> NFT,  $J_{8-7}$ = 8.4 Hz); 8.06 (d,1H, **H**<sub>5</sub> NFT,  $J_{5-6}$ = 8.5 Hz); 7.93 (s,1H, **NH**); 7.78 (t,1H, **H**<sub>7</sub> NFT,  $J_{7-6}$ = 7.5 Hz); 7.70 (t,1H, **H**<sub>6</sub> NFT,  $J_{6-7}$ = 7.5 Hz); 7.03 (sa,2H, **H**<sub>5</sub>+ **H**<sub>8</sub> QX); 2.37 (s,3H, **CH**<sub>3</sub>-C7 QX); 2.22 (s,3H, **CH**<sub>3</sub>-C6 QX) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S):**

	Teórico	Hallado
C%	59,98	59,50
H%	3,80	4,00
N%	13,33	13,41

**2-ciano-7-cloro-3-(2-nitrofenilsulfonamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**  
**(Compuesto 1.2b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> Cl S

**P.M:** 421,6 g/mol

**P.F:** 241°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 4%

**Método de síntesis:** Método C partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando acetato de etilo como fase móvil.

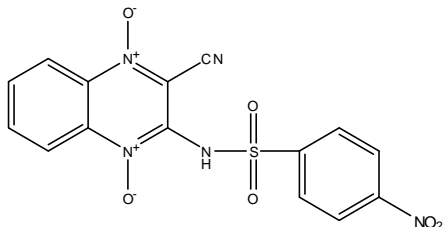
**IR (KBr),  $\nu$ :** 3339 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2234 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1385 (f,  $\nu_{\text{N+O}}$ ); 1181 (f,  $\nu_{\text{S=O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.20 (d,1H, **H<sub>3</sub>** NFN,  $J_{3-4}$ = 7.9 Hz); 8.14 (d,1H, **H<sub>6</sub>** NFN); 8.05 (t,1H, **H<sub>4</sub>** NFN,  $J_{4-3}$ = 7.9 Hz,  $J_{4-5}$ = 7.9 Hz); 7.90 (dd,1H, **H<sub>6</sub>** QX,  $J_{6-5}$ = 6.5 Hz); 7.71 (d,1H, **H<sub>5</sub>** NFN,  $J_{5-3}$ = 2.3 Hz); 7.63 (d,1H, **H<sub>5</sub>** QX,  $J_{5-6}$ = 6.5 Hz); 7.56 (sa,2H, **NH+H<sub>8</sub>** QX) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>ClS):**

	Teórico	Hallado
C%	42,69	43,18
H%	1,89	2,27
N%	16,60	17,09

**2-ciano-3-(4-nitrofenilsulfonamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**  
**(Compuesto 1.3a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> S

**P.M:** 387,1 g/mol

**P.F:** 224°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 4%

**Método de síntesis:** Método C partiendo de benzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando acetato de etilo como fase móvil.

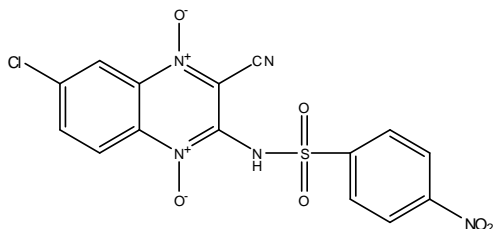
**IR (KBr),  $\nu$ :** 3422 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2233 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1390 (f,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1175 (f,  $\nu_{\text{S=O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.38 (d, 2H, **H**<sub>3</sub>+ **H**<sub>5</sub> NFN,  $J_{3-2}= J_{5-6}= 9.1$  Hz); 8.22 (d, 2H, **H**<sub>2</sub>+ **H**<sub>6</sub> NFN,  $J_{2-3}= J_{6-5}= 9.0$  Hz); 8.10 (dd, 1H, **H**<sub>7</sub> QX,  $J_{7-5}= 1.3$  Hz,  $J_{7-6}= 8.7$  Hz); 7.73 (dd, 1H, **H**<sub>5</sub> QX,  $J_{5-7}= 1.3$  Hz,  $J_{5-6}= 7.8$  Hz); 7.52 (sa, 2H, **NH**+**H**<sub>8</sub> QX); 7.41 (dd, 1H, **H**<sub>6</sub> QX,  $J_{6-5}= 7.8$  Hz,  $J_{6-7}= 8.7$  Hz) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S):**

	Teórico	Hallado
C%	46,49	46,15
H%	2,32	2,32
N%	18,08	17,94

**2-ciano-7-cloro-3-(4-nitrofenilsulfonamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**  
**(Compuesto 1.3b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> Cl S

**P.M:** 421,6 g/mol

**P.F:** 243°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 4%

**Método de síntesis:** Método C partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando acetato de etilo como fase móvil.

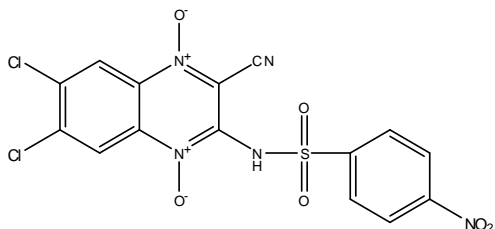
**IR (KBr),  $\nu$ :** 3404 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2230 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1384 (f,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1178 (f,  $\nu_{\text{S=O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.37 (m, 2H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>** NFN); 8.22 (m, 2H, **H<sub>2</sub>+ H<sub>6</sub>** NFN); 8.12 (d, 1H, **H<sub>6</sub>** QX,  $J_{6-8}$ = 2.4 Hz); 7.89 (d, 1H, **H<sub>8</sub>** QX,  $J_{8-6}$ = 2.4 Hz); 7.60 (sa, 2H, **NH+H<sub>5</sub>** QX) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>ClS):**

	Teórico	Hallado
C%	42,69	42,86
H%	1,89	1,97
N%	16,60	17,04

**2-ciano-6,7-dicloro-3-(4-nitrofenilsulfonamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido (Compuesto 1.3g)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> Cl<sub>2</sub> S

**P.M:** 456,1 g/mol

**P.F:** 261°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 3%

**Método de síntesis:** Método C partiendo del 5,6-diclorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando acetato de etilo como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3356 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2227 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1385 (f,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1172 (f,  $\nu_{\text{S=O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.43 (d, 2H, **H**<sub>3</sub>+ **H**<sub>5</sub> NFN,  $J_{3-2}= J_{5-6}= 9.0$  Hz); 8.36 (s, 1H, **NH**); 8.25 (d, 2H, **H**<sub>2</sub>+**H**<sub>6</sub> NFN,  $J_{2-3}= J_{6-5}= 9.0$  Hz); 7.43 (sa, 2H, **H**<sub>5</sub>+ **H**<sub>8</sub> QX) ppm

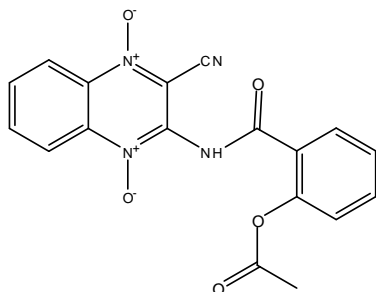
**Análisis Elemental (C<sub>15</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>S):**

	Teórico	Hallado
C%	39,46	39,96
H%	1,53	1,79
N%	15,34	15,09



**3-(2-acetoxibenzamido)-2-cianoquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 2a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**P.M:** 364 g/mol

**P.F:** 165°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 27%

**Método de síntesis:** Método D partiendo de benzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (6:4) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3112 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2238 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1701 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1331 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

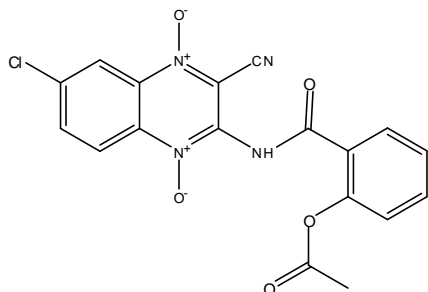
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 10.35 (s, 1H, NH); 8.40 (dd, 1H, H<sub>8</sub> QX,  $J_{8-6}$ = 0.9 Hz,  $J_{8-7}$ = 8.5 Hz); 8.25 (d, 1H, H<sub>7</sub> QX,  $J_{7-8}$ = 8.6 Hz,  $J_{7-6}$ = 8.6 Hz); 7.95 (ddd, 1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-8}$ = 1.2 Hz,  $J_{6-5}$ = 7.1 Hz,  $J_{6-7}$ = 8.5 Hz); 7.86 (d, 1H, H<sub>5</sub> QX); 7.49 (dd, 1H, H<sub>6</sub> ACTB,  $J_{6-4}$ = 1.5 Hz,  $J_{6-5}$ = 7.7 Hz); 7.24 (t, 1H, H<sub>5</sub> ACTB,  $J_{5-6}$ = 7.7 Hz,  $J_{5-4}$ = 7.7 Hz); 6.86 (t, 1H, H<sub>4</sub> ACTB,  $J_{4-5}$ = 7.9 Hz,  $J_{4-3}$ = 8.0 Hz); 6.66 (d, 1H, H<sub>3</sub> ACTB,  $J_{3-4}$ = 8.2 Hz); 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	59,34	58,94
H%	3,29	3,32
N%	15,38	15,15

**3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-7-cloroquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 2b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> Cl

**P.M:** 398,5 g/mol

**P.F:** 173°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 26%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (6:4) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3110 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2231 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1702 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1324 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}-}$ ) cm<sup>-1</sup>

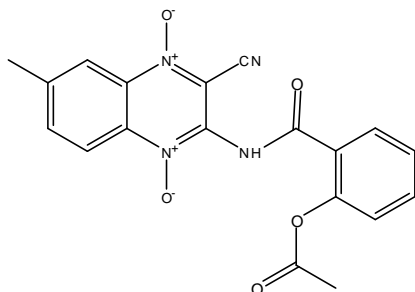
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.65 (s,1H, NH); 8.50 (d,1H, **H**<sub>8</sub> QX,  $J_{8-6}$ = 2.4 Hz); 8.14 (dd,1H, **H**<sub>6</sub> QX,  $J_{6-8}$ = 2.2 Hz,  $J_{6-5}$ = 9.5 Hz); 7.83 (dd, 1H, **H**<sub>6</sub> ACTB,  $J_{6-4}$ = 1.3 Hz,  $J_{6-5}$ = 7.6 Hz); 7.70 (dt,1H, **H**<sub>4</sub> ACTB,  $J_{4-6}$ = 1.6 Hz,  $J_{4-3}$ = 7.7 Hz,  $J_{4-5}$ = 7.6 Hz); 7.48 (t,1H, **H**<sub>5</sub> ACTB,  $J_{5-6}$ = 7.6 Hz,  $J_{5-4}$ = 7.6 Hz); 7.35 (dd,1H, **H**<sub>3</sub> ACTB,  $J_{3-5}$ = 0.8 Hz,  $J_{3-4}$ = 8.1 Hz); 7.08 (s,1H, **H**<sub>5</sub> QX); 2.09 (s,3H, CH<sub>3</sub>-CO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Cl):**

	Teórico	Hallado
C%	54,20	54,58
H%	2,76	2,94
N%	14,05	14,54

**3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-7-metilquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 2c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**P.M:** 378 g/mol

**P.F:** 162°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 27%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-metilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (6:4) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3118 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2362 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1699 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1329 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

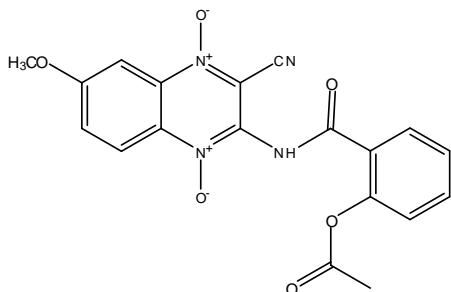
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.51 (s, 1H, NH); 8.38 (dd, 1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-8}$  = 2.8 Hz,  $J_{6-5}$  = 8.8 Hz); 8.32 (d, 1H, H<sub>8</sub> QX); 8.04 (dd, 1H, H<sub>6</sub> ACTB,  $J_{6-5}$  = 8.0 Hz); 7.70 (dt, 1H, H<sub>5</sub> ACTB,  $J_{5-3}$  = 1.5 Hz,  $J_{5-4}$  = 7.9 Hz,  $J_{5-6}$  = 7.9 Hz); 7.48 (dt, 1H, H<sub>4</sub> ACTB,  $J_{4-6}$  = 0.9 Hz,  $J_{4-5}$  = 7.9 Hz); 7.35 (d, 1H, H<sub>3</sub> ACTB,  $J_{3-4}$  = 8.0 Hz); 7.08 (d, 1H, H<sub>5</sub> QX); 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C7 QX); 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	60,31	59,95
H%	3,70	3,70
N%	14,81	14,64

**3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-7-metoxiquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 2d)**



**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>

**P.M:** 394 g/mol

**P.F:** 163°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 26%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-metoxibenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (6:4) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3289 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2241 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1698 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1326 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

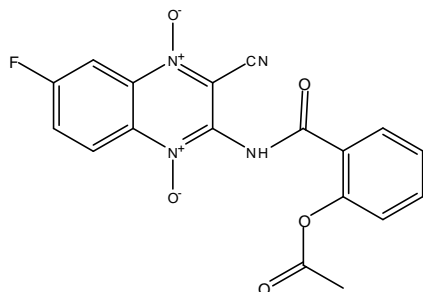
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.44 (s,1H, NH); 8.45 (d,1H, H<sub>8</sub> QX,  $J_{8-6}$  = 1.6 Hz); 7.83 (dd,1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-8}$  = 1.6 Hz,  $J_{6-5}$  = 7.7 Hz); 7.78 (d,1H, H<sub>6</sub> ACTB,  $J_{6-5}$  = 2.8 Hz); 7.71 (d,1H, H<sub>5</sub> ACTB,  $J_{5-6}$  = 2.8 Hz); 7.68 (d,1H, H<sub>5</sub> QX); 7.48 (dt,1H, H<sub>4</sub> ACTB,  $J_{4-6}$  = 1.1 Hz,  $J_{4-3}$  = 7.5 Hz); 7.34 (dd,1H, H<sub>3</sub> ACTB,  $J_{3-5}$  = 1.1 Hz,  $J_{3-4}$  = 7.5 Hz); 4.03 (s,3H, CH<sub>3</sub>O-C7 QX); 2.29 (s,3H, CH<sub>3</sub>-CO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	57,86	57,46
H%	3,55	3,46
N%	14,21	13,95

**3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-7-fluoroquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 2e)**



**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>F

**P.M:** 382 g/mol

**P.F:** 175°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 26%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-fluorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (6:4) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3116 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2240 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1701 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1324 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

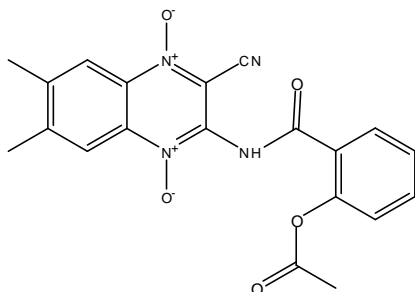
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.60 (s, 1H, NH); 8.60 (m, 1H, H<sub>6</sub> ACTB); 8.30 (dd, 1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-8}$  = 2.0 Hz,  $J_{6-5}$  = 8.3 Hz); 8.04 (d, 1H, H<sub>8</sub> QX,  $J_{8-6}$  = 1.8 Hz); 7.83 (d, 1H, H<sub>3</sub> ACTB,  $J_{3-4}$  = 7.7 Hz); 7.70 (t, 1H, H<sub>5</sub> ACTB,  $J_{5-4}$  = 7.8 Hz,  $J_{5-6}$  = 7.8 Hz); 7.49 (t, 1H, H<sub>4</sub> ACTB,  $J_{4-5}$  = 7.6 Hz,  $J_{4-3}$  = 7.6 Hz); 7.35 (d, 1H, H<sub>5</sub> QX,  $J_{5-6}$  = 8.2 Hz); 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>F):**

	Teórico	Hallado
C%	56,54	56,14
H%	2,87	2,98
N%	14,65	14,43

**3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-6,7-dimetilquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 2f)**



**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**P.M:** 392 g/mol

**P.F:** 135°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 26%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5,6-dimetilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (6:4) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3265 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2220 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1694 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1332 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}-}$ ) cm<sup>-1</sup>

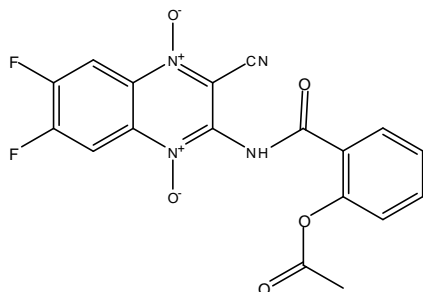
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.45 (s,1H, NH); 8.33 (s,1H, H<sub>5</sub> QX); 8.28 (s,1H, H<sub>8</sub> QX); 7.83 (dd,1H, H<sub>6</sub> ACTB,  $J_{6-4}$ = 1.5 Hz,  $J_{6-5}$ = 7.6 Hz); 7.69 (ddd, 1H, H<sub>4</sub> ACTB,  $J_{4-6}$ = 1.6 Hz,  $J_{4-5}$ = 7.5 Hz,  $J_{4-3}$ = 8.1 Hz); 7.48 (dt,1H, H<sub>5</sub> ACTB,  $J_{5-6}$ = 7.5 Hz); 7.35 (dd,1H, H<sub>3</sub> ACTB,  $J_{3-4}$ = 8.1 Hz); 2.54 (s,3H, CH<sub>3</sub>-C6 QX); 2.53 (s,3H, CH<sub>3</sub>-C7 QX); 2.30 (s,3H, CH<sub>3</sub>-CO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	61,22	60,84
H%	4,08	4,01
N%	14,28	14,17

**3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-6,7-difluoroquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 2h)**



**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>F<sub>2</sub>

**P.M:** 400 g/mol

**P.F:** 188°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 25%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5,6-difluorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (6:4) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3087 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2310 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1701 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1340 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}-}$ ) cm<sup>-1</sup>

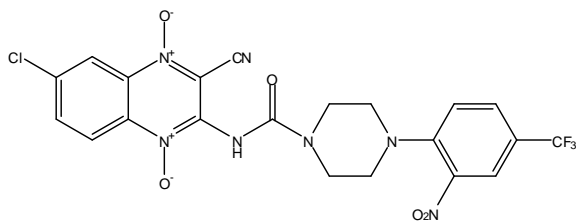
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.67 (s,1H, NH); 8.61 (sa,2H, H<sub>5</sub>+ H<sub>8</sub> QX); 7.82 (d,1H, H<sub>6</sub> ACTB,  $J_{6-5}$ = 7.3 Hz); 7.69 (d,1H, H<sub>3</sub> ACTB,  $J_{3-4}$ = 5.9 Hz); 7.48 (sa,1H, H<sub>4</sub> ACTB); 7.35 (d,1H, H<sub>5</sub> ACTB,  $J_{5-4}$ = 6.7 Hz); 2.29 (s,3H, CH<sub>3</sub>-CO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>F<sub>2</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	54,00	53,97
H%	2,50	2,73
N%	14,00	13,99

**2-ciano-7-cloro-3-(4-(2-nitro-4-trifluorometilfenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.1b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>Cl

**P.M:** 537,5 g/mol

**P.F:** 143°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 30%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3105 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2211 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1533 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1326 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.30 (m, 1H, H<sub>5</sub> FENIL); 8.24 (s, 1H, H<sub>3</sub> FENIL); 8.19 (s, 1H, H<sub>8</sub> QX); 8.11 (s, 1H, NH); 7.89 (m, 1H, H<sub>6</sub> FENIL); 7.62 (d, 1H, H<sub>5</sub> QX,  $J_{5-6} = 8.7$  Hz); 7.49 (dd, 1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-8} = 4.4$  Hz,  $J_{6-5} = 8.8$  Hz); 3.67 (m, 4H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> PIPZ); 3.23 (m, 4H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> PIPZ) ppm

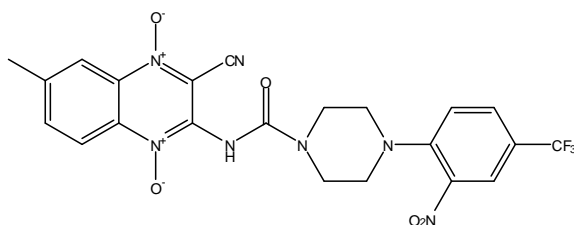
**Análisis Elemental (C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>Cl):**

	Teórico	Hallado
C%	46,88	46,74
H%	2,79	2,94
N%	18,23	18,18



**2-ciano-7-metil-3-(4-(2-nitro-4-trifluorometilfenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.1c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>

**P.M:** 517 g/mol

**P.F:** 167°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 50%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5-metilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3098 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2231 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1549 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1328 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

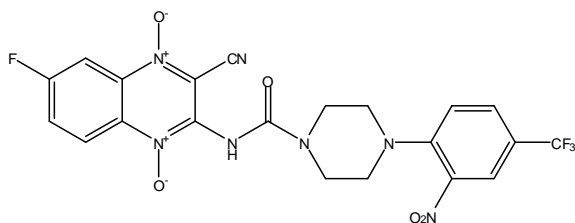
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.24 (d,1H, **H<sub>6</sub>** FENIL,  $J_{6-5}$ = 8.7 Hz); 8.20 (d,1H, **H<sub>3</sub>** FENIL,  $J_{3-5}$ = 2.3 Hz); 8.17 (s,1H, **NH**); 7.93 (d, 1H, **H<sub>8</sub>** QX); 7.90 (dd,1H, **H<sub>5</sub>** FENIL,  $J_{5-3}$ = 2.2 Hz,  $J_{5-6}$ = 8.7 Hz); 7.83 (dd,1H, **H<sub>6</sub>** QX,  $J_{6-8}$ = 1.9 Hz,  $J_{6-5}$ = 9.0 Hz); 7.50 (d,1H, **H<sub>5</sub>** QX,  $J_{5-6}$ = 9.1 Hz); 3.68 (m,4H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>** PIPZ); 3.25 (m,4H, **H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>** PIPZ); 2.54 (s,3H, **CH<sub>3</sub>-C7** QX) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	51,06	51,28
H%	3,48	3,46
N%	18,95	19,03

**2-ciano-7-fluoro-3-(4-(2-nitro-4-trifluorometilfenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.1e)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>4</sub>

**P.M:** 521 g/mol

**P.F:** 179°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 15%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5-fluorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3108 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2362 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1533 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1321 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

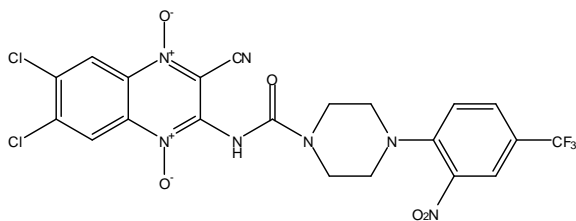
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.37 (m, 1H, **H<sub>5</sub>** FENIL); 8.20 (s, 1H, **H<sub>3</sub>** FENIL); 8.12 (d, 1H, **H<sub>6</sub>** QX,  $J_{6-5}$  = 9.2 Hz); 7.90 (s, 1H, NH); 7.88 (sa, 1H, **H<sub>6</sub>** FENIL); 7.50 (d, 1H, **H<sub>5</sub>** QX,  $J_{5-6}$  = 9.1 Hz); 7.44 (s, 1H, **H<sub>8</sub>** QX); 3.68 (m, 4H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>** PIPZ); 3.25 (m, 4H, **H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>** PIPZ) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>4</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	48,36	47,92
H%	2,87	2,94
N%	18,80	18,31

**2-ciano-6,7-dicloro-3-(4-(2-nitro-4-trifluorometilfenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.1g)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>

**P.M:** 572 g/mol

**P.F:** 174°C

**Aspecto:** sólido rojizo

**Rendimiento:** 20%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5,6-diclorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3104 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2240 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1532 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1330 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

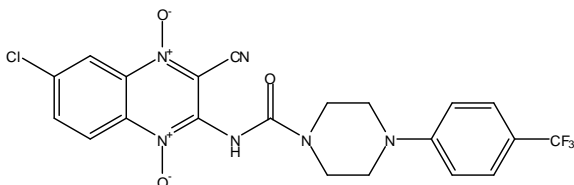
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.31 (s,1H, **H<sub>3</sub>** FENIL); 8.25 (s,1H, **NH**); 8.18 (s,1H, **H<sub>5</sub>** QX); 7.88 (s,1H, **H<sub>8</sub>** QX); 7.74 (sa,1H, **H<sub>5</sub>** FENIL); 7.47 (d,1H, **H<sub>6</sub>** FENIL,  $J_{6-5}$  = 8.1 Hz); 3.42 (m,4H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>** PIPZ); 3.22 (m,4H, **H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>** PIPZ) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	44,05	43,87
H%	2,44	2,50
N%	17,13	17,36

**2-ciano-7-cloro-3-(4-(4-trifluorometilfenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.2b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>Cl

**P.M:** 492,5 g/mol

**P.F:** 162°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 65%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3107 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2234 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1524 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1333 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

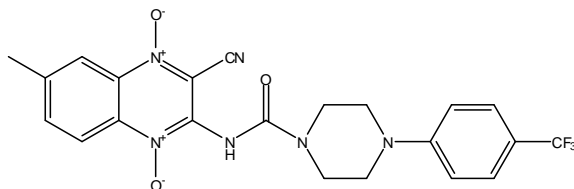
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.13 (s,1H, NH); 7.79 (s,1H, H<sub>8</sub> QX); 7.63 (sa,1H, H<sub>5</sub> QX); 7.58 (m,2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> FENIL); 7.54 (d,1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-5}$ = 9.3 Hz); 7.10 (sa,2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> FENIL); 3.38 (m,4H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> PIPZ); 3.10 (m,4H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> PIPZ) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>Cl):**

	Teórico	Hallado
C%	51,16	50,85
H%	3,24	3,12
N%	17,05	16,93

**2-ciano-7-metil-3-(4-(4-trifluorometilfenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.2c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>

**P.M:** 472 g/mol

**P.F:** 152°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 23%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5-metilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3082 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2233 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1547 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1329 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

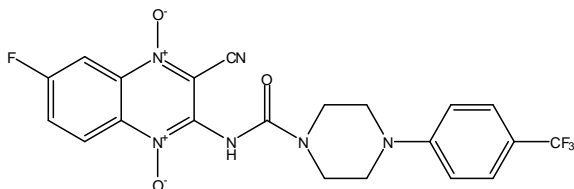
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.02 (s,1H, NH); 7.95 (s,1H, H<sub>6</sub> QX); 7.54 (m, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> FENIL); 7.39 (s,1H, H<sub>8</sub> QX); 7.32 (sa, 1H, H<sub>5</sub> QX); 7.11 (m,2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> FENIL); 3.70 (m,4H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> PIPZ); 2.55 (m,4H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> PIPZ); 2.44 (s,3H, CH<sub>3</sub>-C7 QX) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	55,93	55,67
H%	4,02	3,88
N%	17,79	18,27

**2-ciano-7-fluoro-3-(4-(4-trifluorometilfenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.2e)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>4</sub>

**P.M:** 476 g/mol

**P.F:** 166°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 31%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5-fluorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3106 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2232 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1532 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1332 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

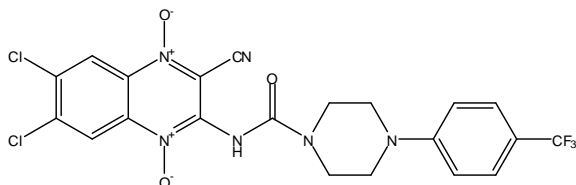
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 7.90 (s,1H, NH); 7.72 (sa,1H, H<sub>6</sub> QX); 7.70 (m, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> FENIL); 7.69 (sa,1H, H<sub>5</sub> QX); 7.53 (s,1H, H<sub>8</sub> QX); 7.45 (sa,2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> FENIL); 3.70 (m,4H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> PIPZ); 2.99 (m,4H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> PIPZ) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>4</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	52,94	52,53
H%	3,36	3,32
N%	17,64	17,76

**2-ciano-6,7-dicloro-3-(4-(4-trifluorometilfenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.2g)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>

**P.M:** 527 g/mol

**P.F:** 169°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 17%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5,6-diclorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3111 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2364 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1525 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1331 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

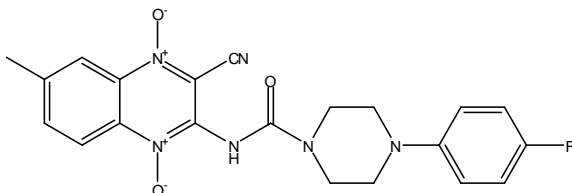
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 7.88 (s,1H, NH); 7.73 (sa, 2H, H<sub>5</sub>+H<sub>8</sub> QX); 7.53 (m,2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> FENIL); 7.11 (m,2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> FENIL); 3.42 (m,4H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> PIPZ); 3.10 (m,4H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> PIPZ) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	47,81	47,32
H%	2,84	2,97
N%	15,93	16,07

**2-ciano-3-(4-(4-fluorofenil)piperazina-1-carboxamido)-7-  
metilquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.3c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F

**P.M:** 422 g/mol

**P.F:** 158°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 79%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5-metilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3079 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2231 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1538 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1344 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.17 (d,1H, **H<sub>5</sub>** QX,  $J_{5-6}$ = 9.5 Hz); 7.94 (s, 1H, **NH**); 7.81 (d,1H, **H<sub>6</sub>** QX,  $J_{6-5}$ = 9.4 Hz); 7.33 (s,1H, **H<sub>8</sub>** QX); 7.07 (t,2H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>** FENIL,  $J_{3-5}=J_{5-3}$ = 7.7 Hz); 7.01 (m,2H, **H<sub>2</sub>-H<sub>6</sub>** FENIL); 3.68 (sa,4H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>** PIPZ); 3.13 (sa,4H, **H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>** PIPZ); 2.54 (s,3H, **CH<sub>3</sub>-C7** QX) ppm

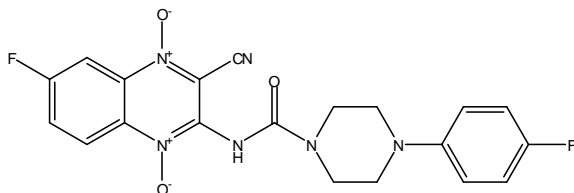
**Análisis Elemental (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F):**

	Teórico	Hallado
C%	59,71	59,80
H%	4,50	4,55
N%	19,90	19,51



**2-ciano-7-fluoro-3-(4-(4-fluorofenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.3e)**



**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>2</sub>

**P.M:** 426 g/mol

**P.F:** 174°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 23%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5-fluorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3109 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2231 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1534 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1354 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

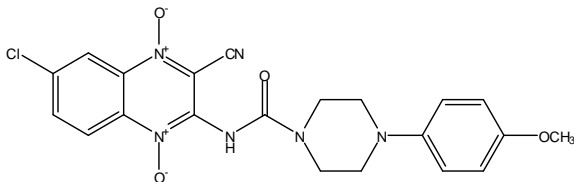
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.40 (dd,1H, **H<sub>6</sub> QX**,  $J_{6-8}$ = 5.0 Hz,  $J_{6-5}$ = 9.0 Hz); 8.13 (d,1H, **H<sub>5</sub> QX**,  $J_{5-6}$ = 9.0 Hz); 7.91 (s,1H, **NH**); 7.45 (s,1H, **H<sub>8</sub> QX**); 7.08 (t,2H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> FENIL**,  $J_{3-5}$ =  $J_{5-3}$ = 8.3 Hz); 7.01 (m,2H, **H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> FENIL**); 3.68 (sa,4H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> PIPZ**); 3.13 (sa,4H, **H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> PIPZ**) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>2</sub>):**

	Teórico	Hallado
<b>C%</b>	56,33	55,84
<b>H%</b>	3,75	3,68
<b>N%</b>	19,71	19,53

**2-ciano-7-cloro-3-(4-(4-metoxifenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.4b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> Cl

**P.M:** 454,5 g/mol

**P.F:** 160°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 12%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3115 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2228 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1540 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1351 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

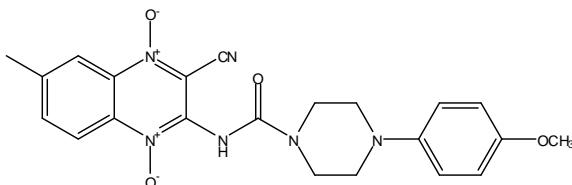
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.19 (d,1H, **H<sub>6</sub>** QX); 8.12 (s,1H, **NH**); 7.63 (d, 1H, **H<sub>5</sub>** QX,  $J_{5-6} = 5.6$  Hz); 7.58 (s,1H, **H<sub>8</sub>** QX); 6.92 (m,2H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>** FENIL); 6.84 (m,2H, **H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>** FENIL); 3.69 (s,3H, **CH<sub>3</sub>O**); 3.20 (m,4H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>** PIPZ); 3.02 (m,4H, **H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>** PIPZ) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Cl):**

	Teórico	Hallado
C%	55,44	54,97
H%	4,18	3,95
N%	18,48	18,21

**2-ciano-7-metil-3-(4-(4-metoxifenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.4c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>

**P.M:** 434 g/mol

**P.F:** 193°C

**Aspecto:** sólido marrón

**Rendimiento:** 32%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5-metilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3120 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2230 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1546 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1328 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}-}$ ) cm<sup>-1</sup>

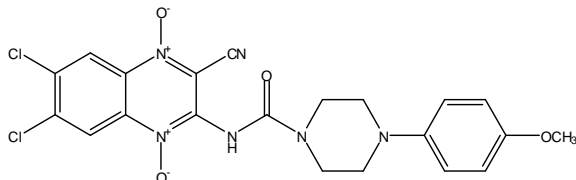
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.02 (d,1H, **H<sub>5</sub>** QX,  $J_{5-6}$ = 8.6 Hz); 7.94 (s,1H, **NH**); 7.61 (dd, 1H, **H<sub>6</sub>** QX,  $J_{6-8}$ = 1.8 Hz,  $J_{6-5}$ = 8.6 Hz); 7.52 (d,1H, **H<sub>8</sub>** QX); 7.39 (m,2H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>** FENIL); 7.32 (sa,2H, **H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>** FENIL); 3.69 (s,3H, **CH<sub>3</sub>O**); 3.41 (m,4H, **H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>** PIPZ); 3.29 (m,4H, **H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>** PIPZ); 2.45 (s,3H, **CH<sub>3</sub>-C7** QX) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>):**

	Teórico	Hallado
<b>C%</b>	60,82	61,20
<b>H%</b>	5,06	4,61
<b>N%</b>	19,35	19,84

**2-ciano-6,7-dicloro-3-(4-(4-metoxifenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 3.4g)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> Cl<sub>2</sub>

**P.M:** 489 g/mol

**P.F:** 171°C

**Aspecto:** sólido granate

**Rendimiento:** 11%

**Método de síntesis:** Método E partiendo del 5,6-diclorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (99:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3115 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2229 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1542 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1352 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

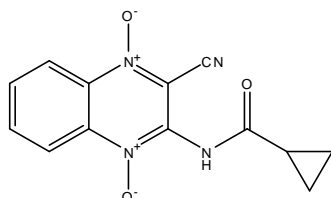
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 8.29 (s,1H, NH); 7.87 (s, 1H, H<sub>8</sub> QX); 7.73 (s,1H, H<sub>5</sub> QX); 6.92 (m,2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> FENIL); 6.84 (m,2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> FENIL); 3.69 (s,3H, CH<sub>3</sub>O); 3.29 (m,4H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> PIPZ); 3.18 (m,4H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> PIPZ) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	51,53	51,05
H%	3,68	3,49
N%	17,17	17,02

**2-ciano-3-(ciclopropilcarboxamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 4.1a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**P.M:** 270 g/mol

**P.F:** 219°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 21%

**Método de síntesis:** Método D partiendo de benzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3250 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2373 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1692 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1332 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

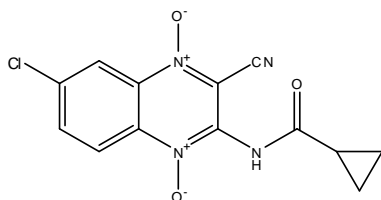
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.54 (s,1H, NH); 8.52 (d,1H, **H**<sub>8</sub>,  $J_{8-7}$ = 8.4 Hz); 8.45 (d,1H, **H**<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$ = 8.2 Hz); 8.08 (t,1H, **H**<sub>7</sub>,  $J_{7-8}$ = 8.3 Hz,  $J_{7-6}$ = 8.3 Hz); 7.99 (t,1H, **H**<sub>6</sub>,  $J_{6-7}$ = 8.3 Hz,  $J_{6-5}$ = 8.3 Hz); 2.26 (m,1H, CH); 0.98 (d,2H, CH<sub>2</sub>); 0.92 (d,2H, CH<sub>2</sub>) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	57,77	57,28
H%	3,70	3,82
N%	20,74	20,44

**2-ciano-3-(ciclopropilcarboxamido)-7-cloroquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 4.1b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> Cl

**P.M:** 304,5 g/mol

**P.F:** 231°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 20%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3245 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2371 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1687 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1326 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}-}$ ) cm<sup>-1</sup>

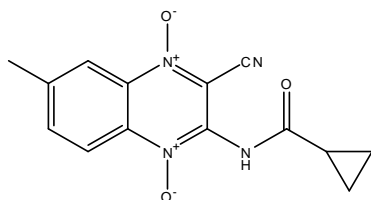
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.64 (s, 1H, NH); 8.50 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-6} = 2.2$  Hz); 8.45 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6} = 9.3$  Hz); 8.02 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-8} = 2.2$  Hz,  $J_{6-5} = 9.2$  Hz); 2.27 (m, 1H, CH); 0.99 (d, 2H, CH<sub>2</sub>); 0.93 (d, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Cl):**

	Teórico	Hallado
C%	51,23	50,86
H%	2,95	3,28
N%	18,39	18,37

**2-ciano-3-(ciclopropilcarboxamido)-7-metilquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 4.1c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**P.M:** 284 g/mol

**P.F:** 230°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 23%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-metilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3247 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2312 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1685 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1328 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

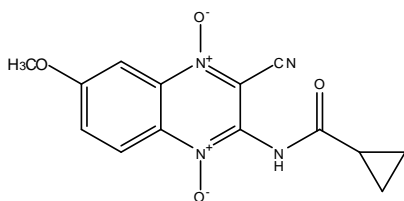
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.49 (s,1H, NH); 8.39 (d,1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$ = 8.6 Hz); 8.26 (s,1H, H<sub>8</sub>); 7.90 (d,1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-5}$ = 8.4 Hz); 2.58 (s,3H, CH<sub>3</sub>-C7); 2.25 (sa,1H, CH); 0.97 (sa,2H,CH<sub>2</sub>); 0.91 (sa,2H,CH<sub>2</sub>) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	59,15	59,09
H%	4,22	4,65
N%	19,71	19,30

**2-ciano-3-(ciclopropilcarboxamido)-7-metoxiquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 4.1d)**



**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

**P.M:** 300 g/mol

**P.F:** 236°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 25%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-metoxibenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3256 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2370 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1691 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1327 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.42 (s,1H, NH); 8.43 (d,1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$ = 9.4 Hz); 7.74 (d,1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-6}$ = 2.7 Hz); 7.69 (dd,1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-8}$ = 2.6 Hz,  $J_{6-5}$ = 9.5 Hz); 4.01 (s,3H, CH<sub>3</sub>O); 2.51 (sa,1H, CH); 0.97 (d,2H, CH<sub>2</sub>); 0.91 (d,2H, CH<sub>2</sub>) ppm

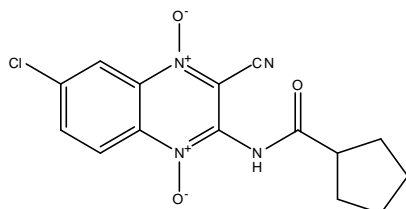
**Análisis Elemental (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	56,00	55,61
H%	4,00	4,12
N%	18,66	18,19



**2-ciano-3-(ciclopentilcarboxamido)-7-cloroquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 4.2b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> Cl

**P.M:** 332,5 g/mol

**P.F:** 229°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 25%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3307 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2315 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1701 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1327 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

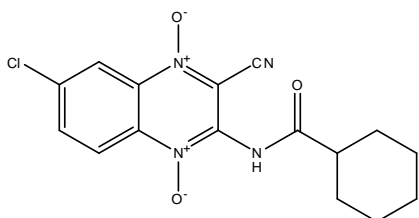
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.24 (s, 1H, NH); 8.49 (d, 1H, H<sub>5</sub> QX,  $J_{5-6}$  = 9.2 Hz); 8.46 (d, 1H, H<sub>8</sub> QX,  $J_{8-6}$  = 2.1 Hz); 8.10 (dd, 1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-8}$  = 2.2 Hz,  $J_{6-5}$  = 9.2 Hz); 3.18 (m, 1H, CH); 1.90 (sa, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>5</sub> ecuatoriales CICLO); 1.81 (sa, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>5</sub> axiales CICLO); 1.68 (sa, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub> ecuatoriales CICLO); 1.60 (sa, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub> axiales CICLO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Cl):**

	Teórico	Hallado
C%	54,13	53,90
H%	3,90	3,77
N%	16,84	17,10

**2-ciano-3-(ciclohexilcarboxamido)-7-cloroquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 4.3b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> Cl

**P.M:** 346,5 g/mol

**P.F:** 245°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 17%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3286 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2236 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1696 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1327 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

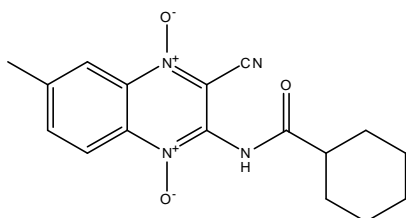
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.19 (s,1H, NH); 8.48 (d,1H, H<sub>5</sub> QX,  $J_{5-6}$ = 9.2 Hz); 8.46 (d,1H, H<sub>8</sub> QX,  $J_{8-6}$ = 2.1 Hz); 8.10 (dd,1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-8}$ = 2.2 Hz,  $J_{6-5}$ = 9.2 Hz); 2.72 (m,1H, CH); 1.86 (d,2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> ecuatoriales CICLO); 1.78 (d,2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> ecuatoriales CICLO); 1.65 (d,2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> axiales CICLO); 1.43 (m,2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> axiales CICLO); 1.25 (d,2H, CH<sub>2</sub><sup>4</sup> CICLO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Cl):**

	Teórico	Hallado
C%	55,41	54,95
H%	4,32	4,59
N%	16,16	16,00

**2-ciano-3-(ciclohexilcarboxamido)-7-metilquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 4.3c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**P.M:** 326 g/mol

**P.F:** 214°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 11%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-metilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3248 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2374 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1691 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1327 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

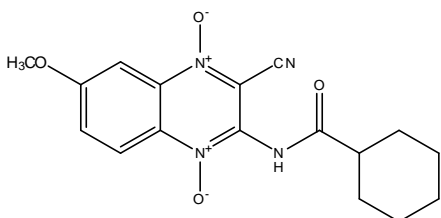
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.07 (s, 1H, NH); 8.03 (d, 1H, H<sub>5</sub> QX,  $J_{5-6}$  = 8.7 Hz); 7.32 (s, 1H, H<sub>8</sub> QX); 7.27 (dd, 1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-8}$  = 1.3 Hz,  $J_{6-5}$  = 8.7 Hz); 2.71 (m, 1H, CH); 2.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C7 QX); 1.87 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> ecuatoriales CICLO); 1.78 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> ecuatoriales CICLO); 1.65 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> axiales CICLO); 1.44 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> axiales CICLO); 1.27 (dd, 2H, CH<sub>2</sub><sup>4</sup> CICLO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	62,57	62,09
H%	5,52	5,43
N%	17,17	16,76

**2-ciano-3-(ciclohexilcarboxamido)-7-metoxiquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 4.3d)**



**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

**P.M:** 342 g/mol

**P.F:** 219°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 30%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-metoxibenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3245 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2373 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1691 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1327 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

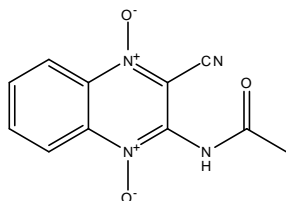
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.01 (s, 1H, NH); 8.41 (d, 1H, H<sub>5</sub> QX,  $J_{5-6} = 9.4$  Hz); 7.74 (d, 1H, H<sub>8</sub> QX,  $J_{8-6} = 2.6$  Hz); 7.69 (dd, 1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-8} = 2.7$  Hz,  $J_{6-5} = 9.4$  Hz); 4.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O); 2.69 (m, 1H, CH); 1.87 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> ecuatoriales CICLO); 1.77 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> ecuatoriales CICLO); 1.65 (d, 1H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub> axiales CICLO); 1.44 (m, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub> axiales CICLO); 1.26 (d, 2H, CH<sub>2</sub><sup>4</sup> CICLO) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	59,64	59,20
H%	5,26	5,34
N%	16,37	16,33

**3-acetamido-2-cianoquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 5.1a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**P.M:** 244 g/mol

**P.F:** 196°C

**Aspecto:** sólido naranja

**Rendimiento:** 15%

**Método de síntesis:** Método D partiendo de benzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3256 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2374 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1524 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1331 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

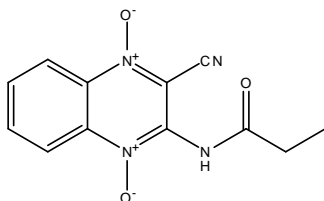
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.29 (s,1H, NH); 8.50 (d,1H, **H**<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$ = 8.5 Hz); 8.45 (d,1H, **H**<sub>8</sub>,  $J_{8-7}$ = 8.5 Hz); 8.08 (t,1H, **H**<sub>6</sub>,  $J_{6-7}$ = 7.6 Hz); 7.99 (dd,1H, **H**<sub>7</sub>,  $J_{7-6}$ = 7.5 Hz,  $J_{7-8}$ = 8.3 Hz); 2.27 (s,3H, CH<sub>3</sub>) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	54,09	53,74
H%	3,27	3,02
N%	22,95	23,43

**2-ciano-3-propionamidoquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 5.2a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**P.M:** 258 g/mol

**P.F:** 191°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 15%

**Método de síntesis:** Método D partiendo de benzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3250 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2236 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1524 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1333 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}-}$ ) cm<sup>-1</sup>

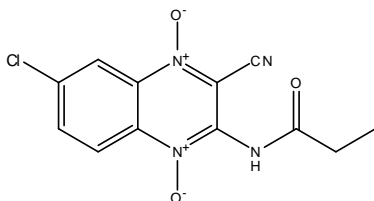
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.26 (s, 1H, NH); 8.51 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 8.6 Hz); 8.46 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-7}$  = 8.4 Hz); 8.08 (t, 1H, H<sub>7</sub>); 8.01 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-5}$  = 8.6 Hz); 2.58 (d, 2H, CH<sub>2</sub>,  $J_{\text{CH}_2-\text{CH}_3}$  = 7.4 Hz); 1.13 (t, 3H, CH<sub>3</sub>,  $J_{\text{CH}_3-\text{CH}_2}$  = 7.3 Hz) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	55,81	56,05
H%	3,87	3,66
N%	21,70	22,10

**2-ciano-7-cloro-3-propionamidoquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 5.2b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> Cl

**P.M:** 292,5 g/mol

**P.F:** 229°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 5%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3254 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2366 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1517 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1321 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

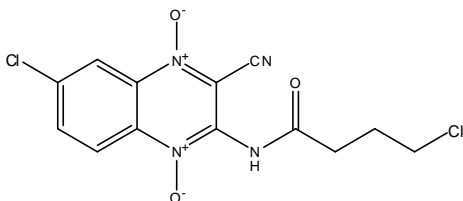
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.28 (s, 1H, NH); 8.49 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 8.6 Hz); 8.46 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 8.09 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-8}$  = 2.4 Hz,  $J_{6-5}$  = 8.6 Hz); 2.58 (d, 2H, CH<sub>2</sub>,  $J_{\text{CH}_2-\text{CH}_3}$  = 7.2 Hz); 1.13 (t, 3H, CH<sub>3</sub>,  $J_{\text{CH}_3-\text{CH}_2}$  = 7.3 Hz) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Cl):**

	Teórico	Hallado
C%	49,23	49,18
H%	3,07	2,84
N%	19,14	19,18

**2-ciano-7-cloro-3-(4-clorobutanamido)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 5.3b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> Cl<sub>2</sub>

**P.M:** 341 g/mol

**P.F:** 196°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 5%

**Método de síntesis:** Método D partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando diclorometano/metanol (97:3) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3256 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 2373 (d,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ); 1517 (f,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ); 1324 (f,  $\nu_{\text{N}+\text{O}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.44 (s, 1H, NH); 8.50 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 9.1 Hz); 8.47 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-6}$  = 2.0 Hz); 8.11 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-8}$  = 2.2 Hz,  $J_{6-5}$  = 9.1 Hz); 3.73 (t, 2H, CH<sub>2</sub><sup>3</sup>,  $J_{3-2}$  = 6.6 Hz); 2.75 (t, 2H, CH<sub>2</sub><sup>2</sup>,  $J_{2-3}$  = 7.0 Hz,  $J_{2-1}$  = 7.0 Hz); 2.08 (t, 2H, CH<sub>2</sub><sup>1</sup>) ppm

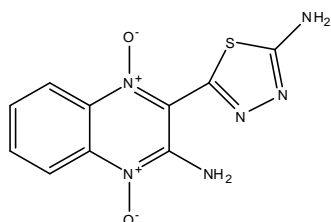
**Análisis Elemental (C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	45,74	45,39
H%	2,93	2,83
N%	16,42	16,48



**3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol-2-il)quinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 6a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> S

**P.M:** 276,1 g/mol

**P.F:** 269°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 15%

**Método de síntesis:** Método F partiendo de benzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (1:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3381 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 3263 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 1625 (f,  $\nu_{\text{C-N}}$ ); 1360 (m,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1183 (f,  $\nu_{\text{C-S}}$ ) cm<sup>-1</sup>

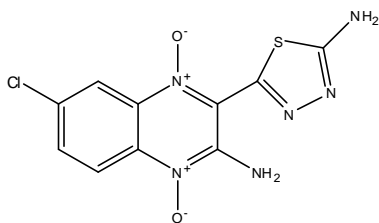
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 16.18 (s, 2H, NH<sub>2</sub> TD); 8.33 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 8.2 Hz); 8.08 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-7}$  = 8.2 Hz); 8.03 (s, 2H, NH<sub>2</sub> QX); 7.84 (t, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-5}$  = 7.8 Hz,  $J_{6-7}$  = 7.8 Hz); 7.69 (t, 1H, H<sub>7</sub>,  $J_{7-6}$  = 7.7 Hz,  $J_{7-8}$  = 7.7 Hz) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S):**

	Teórico	Hallado
C%	43,46	43,91
H%	2,89	2,89
N%	30,42	29,97

**3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol-2-il)-7-cloroquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 6b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> S Cl

**P.M:** 310,6 g/mol

**P.F:** 283°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 13%

**Método de síntesis:** Método F partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (1:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3370 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 3263 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 1624 (f,  $\nu_{\text{C-N}}$ ); 1356 (m,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1191 (f,  $\nu_{\text{C-S}}$ ) cm<sup>-1</sup>

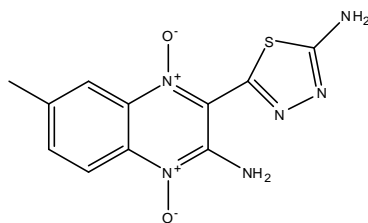
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 16.22 (s, 2H, NH<sub>2</sub> TD); 8.33 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 9.2 Hz); 8.11 (s, 2H, NH<sub>2</sub> QX); 8.02 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-6}$  = 1.9 Hz); 7.85 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-8}$  = 2.2 Hz,  $J_{6-5}$  = 9.2 Hz) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>SCI):**

	Teórico	Hallado
C%	38,63	39,04
H%	2,25	2,02
N%	27,04	27,42

**3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol-2-il)-7-metilquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 6c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S

**P.M:** 290,1 g/mol

**P.F:** 253°C

**Aspecto:** sólido anaranjado

**Rendimiento:** 16%

**Método de síntesis:** Método F partiendo del 5-metilbenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (1:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3381 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 3265 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 1608 (f,  $\nu_{\text{C-N}}$ ); 1364 (m,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1185 (f,  $\nu_{\text{C-S}}$ ) cm<sup>-1</sup>

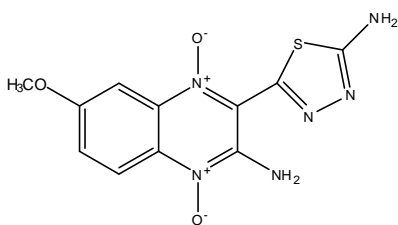
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 16.13 (s,2H, NH<sub>2</sub> TD); 8.23 (d,1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$ = 8.7 Hz); 7.92 (s,2H, NH<sub>2</sub> QX); 7.82 (s,1H, H<sub>8</sub>); 7.68 (d,1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-5}$ = 9.4 Hz); 2.51 (s,3H, CH<sub>3</sub>-C7) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S):**

	Teórico	Hallado
C%	45,50	46,00
H%	3,44	3,59
N%	28,95	28,47

**3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol-2-il)-7-metoxiquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 6d)**



**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> S

**P.M:** 306,1 g/mol

**P.F:** 253°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 12%

**Método de síntesis:** Método F partiendo del 5-metoxibenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (1:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3375 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 3257 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 1621 (f,  $\nu_{\text{C-N}}$ ); 1367 (m,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1193 (f,  $\nu_{\text{C-S}}$ ) cm<sup>-1</sup>

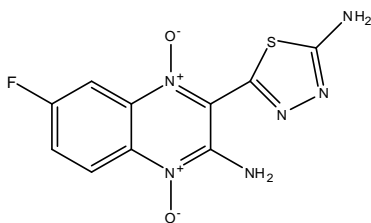
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 16.11 (s, 2H, NH<sub>2</sub> TD); 8.24 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 9.4 Hz); 7.80 (s, 2H, NH<sub>2</sub> QX); 7.49 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-8}$  = 2.6 Hz,  $J_{6-5}$  = 9.4 Hz); 7.37 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-6}$  = 2.5 Hz); 3.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S):**

	Teórico	Hallado
C%	43,12	43,27
H%	3,26	3,46
N%	27,44	26,98

**3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-il)-7-fluoroquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 6e)**



**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S F

**P.M:** 294,1 g/mol

**P.F:** 230°C

**Aspecto:** sólido amarillo

**Rendimiento:** 10%

**Método de síntesis:** Método F partiendo del 5-fluorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (1:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3375 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 3263 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 1629 (f,  $\nu_{\text{C-N}}$ ); 1373 (m,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1188 (f,  $\nu_{\text{C-S}}$ ) cm<sup>-1</sup>

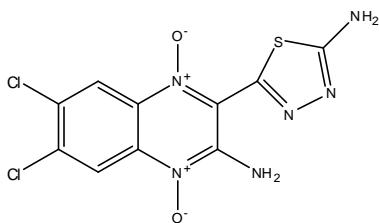
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 16.24 (s, 2H, NH<sub>2</sub> TD); 8.37 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-8} = 5.7$  Hz,  $J_{6-5} = 10.1$  Hz); 8.01 (s, 2H, NH<sub>2</sub> QX); 7.77 (m, 2H, H<sub>5</sub>+ H<sub>8</sub>) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>SF):**

	Teórico	Hallado
C%	40,80	41,20
H%	2,38	2,01
N%	28,56	28,43

**3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol-2-il)-6,7-dicloroquinoxalina 1,4-di-**  
**N-óxido**

**(Compuesto 6g)**



**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> S Cl<sub>2</sub>

**P.M:** 345,1 g/mol

**P.F:** 263°C

**Aspecto:** sólido naranja

**Rendimiento:** 5%

**Método de síntesis:** Método F partiendo del 5,6-diclorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (1:1) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3346 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 3256 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 1615 (f,  $\nu_{\text{C-N}}$ ); 1349 (m,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ); 1184 (f,  $\nu_{\text{C-S}}$ ) cm<sup>-1</sup>

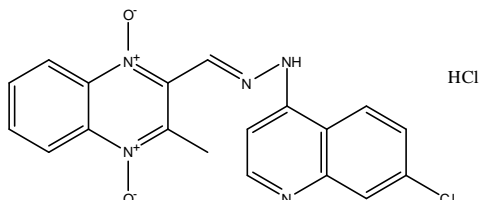
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 16.09 (s, 2H, NH<sub>2</sub> TD); 8.61 (s, 1H, H<sub>5</sub>); 8.29 (s, 2H, NH<sub>2</sub> QX); 8.24 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>SCl<sub>2</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	34,77	34,75
H%	1,73	1,56
N%	24,34	23,96

**Clorhidrato de (E)-2-((2-(7-cloroquinolin-4-il)hidrazono)metil)-3-metilquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 7a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> Cl ·HCl

**P.M:** 416 g/mol

**P.F:** 213°C

**Aspecto:** sólido marrón

**Rendimiento:** 5%

**Método de síntesis:** Método G partiendo de benzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (6:4) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3071 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 1579 (f,  $\nu_{\text{CH-N}}$ ); 1344 (m,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ) cm<sup>-1</sup>

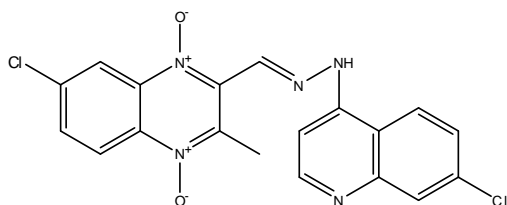
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 12.08 (s, 1H, NH); 9.08 (s, 1H, H<sub>2</sub> QNL); 8.49 (sa, 1H, H<sub>8</sub> QX); 8.47 (sa, 1H, H<sub>5</sub> QX); 8.44 (s, 1H, H<sub>8</sub> QNL); 8.41 (s, 1H, H<sub>5</sub> QNL); 7.92 (m, 2H, H<sub>6</sub>+H<sub>7</sub> QX); 7.90 (d, 1H, H<sub>6</sub> QNL,  $J_{6-5}$  = 7.3 Hz); 7.58 (s, 1H, H<sub>3</sub> QNL); 7.24 (s, 1H, CH); 3.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C3 QX) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Cl ·HCl):**

	Teórico	Hallado
C%	54,80	54,83
H%	3,60	3,97
N%	16,82	16,83

**(E)-7-cloro-2-((2-(7-cloroquinolin-4-il)hidrazono)metil)-3-metilquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 7b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>

**P.M:** 414 g/mol

**P.F:** 210°C

**Aspecto:** sólido granate

**Rendimiento:** 25%

**Método de síntesis:** Método G partiendo del 5-clorobenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (6:4) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3098 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 1608 (f,  $\nu_{\text{CH-N}}$ ); 1311 (m,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 11.99 (s,1H, NH); 9.08 (s,1H, H<sub>2</sub> QNL); 8.66 (s,1H, H<sub>5</sub> QNL); 8.47 (d,1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-5}$ = 8.6 Hz); 8.44 (s,1H, H<sub>8</sub> QNL); 8.42 (s,1H, H<sub>6</sub> QNL); 7.96 (s,1H, CH); 7.93 (d,1H, H<sub>5</sub> QX,  $J_{5-6}$ = 8.4 Hz); 7.63 (s,1H, H<sub>8</sub> QX); 7.28 (s,1H, H<sub>3</sub> QNL); 2.96 (s,3H, CH<sub>3</sub>-C3 QX) ppm

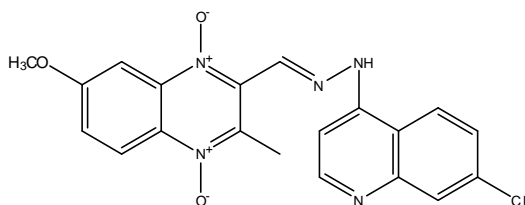
**Análisis Elemental (C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):**

	Teórico	Hallado
C%	55,07	54,67
H%	3,14	3,51
N%	16,90	16,60



**(E)-2-((2-(7-cloroquinolin-4-il)hidrazono)metil)-3-metil-7-metoxiquinoxalina 1,4-di-N-óxido**

**(Compuesto 7d)**



**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> Cl

**P.M:** 409,5 g/mol

**P.F:** 236°C

**Aspecto:** sólido granate

**Rendimiento:** 25%

**Método de síntesis:** Método G partiendo del 5-metoxibenzofuroxano.

**Método de purificación:** cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (6:4) como fase móvil.

**IR (KBr),  $\nu$ :** 3091 (m,  $\nu_{\text{NH}}$ ); 1608 (f,  $\nu_{\text{CH-N}}$ ); 1329 (m,  $\nu_{\text{N+O-}}$ ) cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ :** 12.00 (s,1H, NH); 9.13 (d,1H, H<sub>2</sub> QNL,  $J_{2-3}$ = 2.7 Hz); 8.48 (d,1H, H<sub>5</sub> QNL); 8.43 (d,1H, H<sub>6</sub> QNL,  $J_{6-5}$ = 8.3 Hz); 7.96 (d,1H, H<sub>8</sub> QNL); 7.83 (d,1H, H<sub>5</sub> QX,  $J_{5-6}$ = 9.6 Hz); 7.67 (s,1H, CH); 7.57 (d,1H, H<sub>3</sub> QNL,  $J_{3-2}$ = 2.7 Hz); 7.55 (d,1H, H<sub>6</sub> QX,  $J_{6-5}$ = 9.6 Hz); 7.33 (s,1H, H<sub>8</sub> QX); 2.96 (s,3H, CH<sub>3</sub>-C3 QX); 2.51 (s,3H, CH<sub>3</sub>O) ppm

**Análisis Elemental (C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Cl):**

	Teórico	Hallado
C%	58,60	58,19
H%	3,90	4,10
N%	17,09	16,72



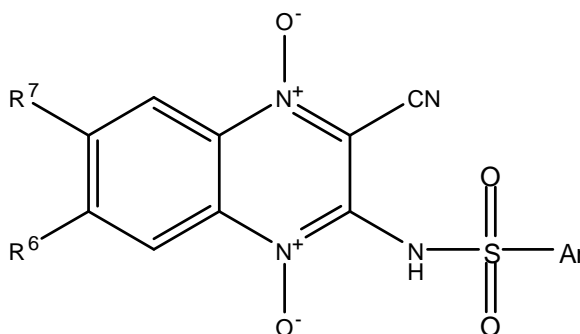
# **XIII. ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA**



#### 44. Resultados de actividad antiplasmódica *in vitro*

Como se ha descrito en el apartado *Material y Métodos*, se ha determinado la actividad antimalárica *in vitro* de la totalidad de los compuestos obtenidos cuyos resultados se muestran en las tablas 11-16, siendo la cloroquina el compuesto de referencia.

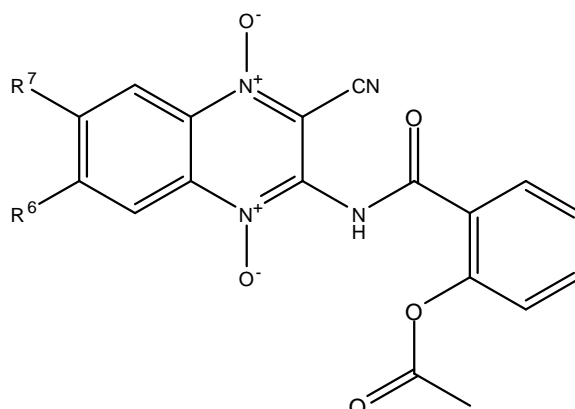
**Tabla 11.** Resultados de actividad antiplasmódica de los compuestos de la serie 1.



Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	Ar	CI <sub>50</sub> (μM)	Índice de CQ
1.1b	Cl/H	2-naftil	>23,4	>117
1.1c	CH <sub>3</sub> /H	2-naftil	>24,6	>123
1.1f	CH <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub>	2-naftil	>23,8	>119
1.2b	Cl/H	<i>o</i> -nitrofenil	17,4 ± 0,5	87
1.3a	H/H	<i>p</i> -nitrofenil	20 ± 2	100
1.3b	Cl/H	<i>p</i> -nitrofenil	>23,7	>118
1.3g	Cl/Cl	<i>p</i> -nitrofenil	18,7 ± 1	93
CQ	-	-	0,2 ± 0,1	1

CI<sub>50</sub>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de cepas FCR-3 de *Plasmodium falciparum* ± la desviación estándar. CQ: cloroquina. Índice de CQ: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la cloroquina.

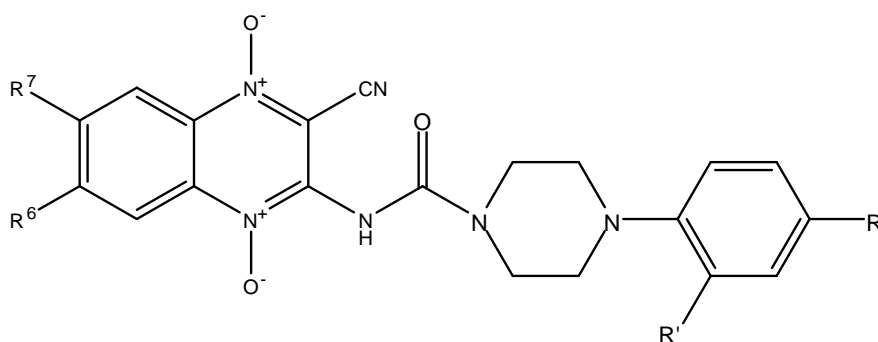
**Tabla 12.** Resultados de actividad antiplasmódica de los compuestos de la serie 2.



Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	CI <sub>50</sub> (μM)	Índice de CQ
<b>2a</b>	H/H	41,4 ± 1,1	138
<b>2b</b>	Cl/H	10,8 ± 1,8	36
<b>2c</b>	CH <sub>3</sub> /H	52,8 ± 1,4	176
<b>2d</b>	CH <sub>3</sub> O/H	27 ± 1,7	90
<b>2e</b>	F/H	7,4 ± 0,6	25
<b>2f</b>	CH <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub>	59,4 ± 2,0	198
<b>2h</b>	F/F	36 ± 0,9	120
<b>CQ</b>	-	0,3 ± 0,01	1

CI<sub>50</sub>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de cepas FCR-3 de *Plasmodium falciparum* ± la desviación estándar. CQ: cloroquina. Índice de CQ: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la cloroquina.

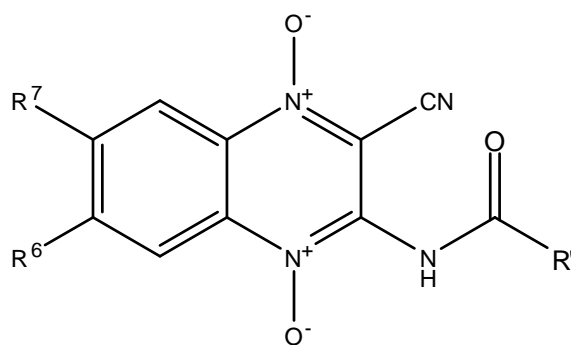
**Tabla 13.** Resultados de actividad antiplasmodica de los compuestos de la serie 3.



Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	R''/R'	CI <sub>50</sub> (μM)	Índice de CQ
<b>3.1b</b>	Cl/H	CF <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub>	24,5	245
<b>3.1c</b>	CH <sub>3</sub> /H	CF <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub>	44,7	447
<b>3.1e</b>	F/H	CF <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub>	14,6	146
<b>3.1g</b>	Cl/Cl	CF <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub>	13,9	139
<b>3.2b</b>	Cl/H	CF <sub>3</sub> /H	18,6	186
<b>3.2c</b>	CH <sub>3</sub> /H	CF <sub>3</sub> /H	30,5	305
<b>3.2e</b>	F/H	CF <sub>3</sub> /H	30,9	309
<b>3.2g</b>	Cl/Cl	CF <sub>3</sub> /H	18,5	185
<b>3.3c</b>	CH <sub>3</sub> /H	F/H	36,3	363
<b>3.3e</b>	F/H	F/H	34,3	343
<b>3.4b</b>	Cl/H	CH <sub>3</sub> O/H	12,8	128
<b>3.4c</b>	CH <sub>3</sub> /H	CH <sub>3</sub> O/H	30,4	304
<b>3.4g</b>	Cl/Cl	CH <sub>3</sub> O/H	26,1	261
<b>CQ</b>	-	-	0,1	1

CI<sub>50</sub>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de cepas FCR-3 de *Plasmodium falciparum*. CQ: cloroquina. Índice de CQ: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la cloroquina.

**Tabla 14.** Resultados de actividad antiplasmódica de los compuestos de las series 4 y 5.

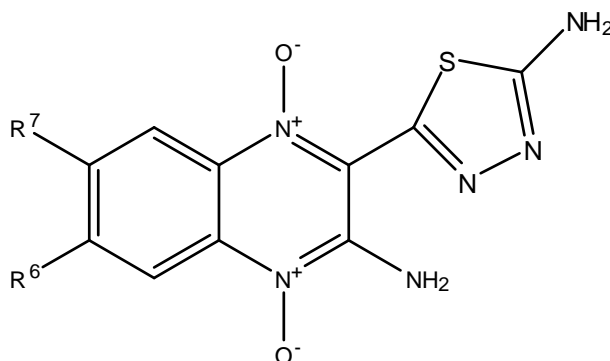


Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	R'	CI <sub>50</sub> (μM)	Índice de CQ
4.1a	H/H	ciclopropil	18,30	91
4.1b	Cl/H	ciclopropil	13,33	67
4.1c	CH <sub>3</sub> /H	ciclopropil	31,04	155
4.1d	CH <sub>3</sub> O/H	ciclopropil	27,80	139
4.2b	Cl/H	ciclopentil	2,90	14
4.3b	Cl/H	ciclohexil	7,50	37
4.3c	CH <sub>3</sub> /H	ciclohexil	21,62	108
4.3d	CH <sub>3</sub> O/H	ciclohexil	12,99	65
5.1a	H/H	metil	6,20	31
5.2a	H/H	acetil	5,30	26
5.2b	Cl/H	acetil	4,30	21
5.3b	Cl/H	3- cloropropil	5,70	28
CQ	-	-	0,20	1

CI<sub>50</sub>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de cepas FCR-3 de *Plasmodium falciparum*. CQ: cloroquina. Índice de CQ: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la cloroquina.



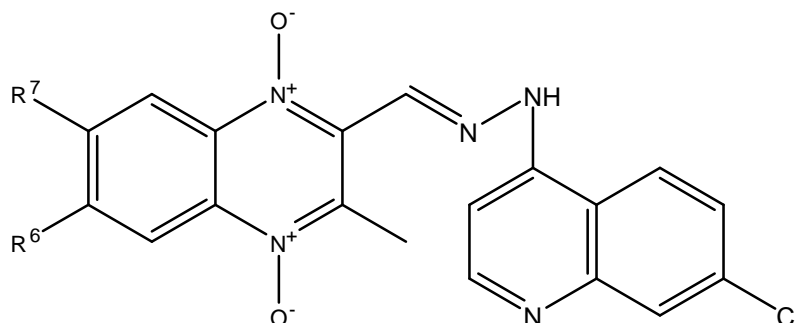
**Tabla 15.** Resultados de actividad antiplasmódica de los compuestos de la serie 6.



Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	CI <sub>50</sub> (μM)	Índice de CQ
<b>6a</b>	H/H	261,60	>1000
<b>6b</b>	Cl/H	145,40	727
<b>6c</b>	CH <sub>3</sub> /H	151,10	755
<b>6d</b>	CH <sub>3</sub> O/H	174,20	871
<b>6e</b>	F/H	205,70	>1000
<b>6g</b>	Cl/Cl	51,91	260
<b>CQ</b>	-	0,20	1

CI<sub>50</sub>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de cepas FCR-3 de *Plasmodium falciparum*. CQ: cloroquina. Índice de CQ: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la cloroquina.

**Tabla 16.** Resultados de actividad antiplasmódica de los compuestos de la serie 7.



Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	CI <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	Índice de CQ
<b>7a</b>	H/H	25,86	-	199
<b>7b</b>	Cl/H	-	0,24	6
<b>7d</b>	CH <sub>3</sub> O/H	-	1,38	34
<b>CQ</b>	-	0,13	0,04	1

CI<sub>50</sub><sup>a</sup>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de cepas FCR-3 de *Plasmodium falciparum*. CI<sub>50</sub><sup>b</sup>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de cepas 3D7A de *Plasmodium falciparum*. CQ: cloroquina. Índice de CQ: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la cloroquina.

## 45. Discusión de la actividad antiplasmódica *in vitro*

El estudio del comportamiento de los compuestos de las diferentes series en el ensayo de actividad antiplasmódica *in vitro* en las cepas FCR-3 y 3D7A, ha sido suficiente para comprobar que en todas las series (1-7), son generalmente más activos los derivados con átomos electroatrayentes en posiciones 7 y/o 6 que los derivados que poseen grupos electrodonantes o no se encuentran sustituidos en esas posiciones.

Con respecto a los compuestos de la **serie 1**, ninguno de los derivados de sulfonamidas presenta actividad antimalárica interesante, siendo de 60 a 80 veces menos activo que la cloroquina, aunque ésta aumenta ligeramente con la presencia de halógenos en posiciones 6 y 7, con la excepción del compuesto **1.3b**.

En relación a los compuestos de la **serie 2**, la mayoría de derivados de acetoxibenzamidas resultan escasamente activos frente a la cepa FCR-3 de *P. falciparum*, siendo de 90 a 100 veces menos activos que la cloroquina, a excepción de los compuestos **2b** y **2e** que presentan buena actividad. De manera interesante, se observa que la actividad aumenta de 4 a 7 veces con la presencia de un átomo electroatrayente en posición 7 con respecto al derivado que no se encuentra sustituido o que posee grupo metilo en dicha posición.

De entre los compuestos de la **serie 3**, **3.1e**, **3.1g** y **3.4b** presentan buena actividad, mientras que el resto de compuestos son inactivos o presentan baja o moderada actividad. En general la presencia de átomos electroatrayentes en posiciones 7 y/o 6 mejoran la actividad antiplasmódica, siendo el peor sustituyente el que posee un grupo metilo, es decir el grupo electrodonante, en posición 7. La presencia de un grupo nitro en la posición R' disminuye la actividad del derivado con grupo electrodonante (metilo) en posición 7. La presencia de un átomo de flúor y de un grupo metoxi en posición R'', no mejora la actividad respecto a los derivados con un grupo trifluorometil en dicha posición.

Con respecto a las **series 4** y **5**, los compuestos **4.2b** y **5.2b** son altamente activos, los compuestos **4.1b**, **4.3b**, **4.3d**, **5.1a**, **5.2a** y **5.3b** presentan actividad prometedora y los compuestos **4.1a**, **4.1d** y **4.3c** son moderadamente activos. El resto de compuestos son inactivos o presentan baja actividad. Al igual que en las series anteriores, los derivados que poseen un grupo electrodonante en posición 7 generalmente son los menos activos,

y la presencia de átomos electroatrayentes en dicha posición aumenta la actividad con respecto a los derivados no sustituidos o que presentan grupos electrodonantes. La comparativa basada en el número de carbonos del que constan los ciclos unidos al grupo carboxamido de la **serie 4**, muestra un descenso de la actividad en el siguiente orden: ciclopentil>ciclohexil>ciclopropil. En referencia a la longitud de la cadena alifática unida al grupo carboxamido de los compuestos de la **serie 5**, se produce un aumento de la actividad conforme ésta aumenta, como se observa en la actividad entre los compuestos **5.1a** y **5.2a**.

Con objeto de evaluar la influencia del grupo carbonitrilo en la posición 2 del anillo de quinoxalina, se diseñó una serie paralela a las anteriores pero con un grupo tiodiazol-amina en dicha posición. Debido al bajo rendimiento obtenido en la etapa de sustitución, ha resultado inviable la obtención de dichos compuestos, siendo los compuestos intermedios sintetizados estimados como compuestos finales de la **serie 6**. Dichos compuestos se han mostrado inactivos frente a la cepa FCR-3 de *P. falciparum*, aunque la disustitución de halógenos en posiciones 6 y 7 (compuesto **6g**), mejora notablemente la actividad antiplasmódica.

Los compuestos de la **serie 7** ensayados frente a la cepa de *Plasmodium falciparum* FCR-3, **7b** y **7d**, son altamente activos, mientras que el derivado no sustituido mostró actividad moderada frente a la cepa 3D7A. Una vez más, la presencia de un átomo electroatrayente en posición 7 del anillo de quinoxalina, mejora notablemente la actividad antiplasmódica.

A pesar de que la actividad antiplasmódica no puede ser comparada entre compuestos de todas las series, ya que han sido ensayados en cepas distintas de *Plasmodium falciparum* y/o algunos no poseen características estructurales que lo permitan, sí se puede observar que en general los compuestos que forman parte de la serie 7 han sido los que han mostrado la mejor actividad antimalárica. Además, de los cuatro compuestos sintetizados que han mostrado notable actividad, tres de ellos presentan un átomo de cloro en posición 7. De la comparativa del sustituyente en posición 3, entre las cinco primeras series, los compuestos que presentan una cadena alifática y un ciclopentano unidos a un grupo carboxamido, han sido los que han mostrado mayor actividad antiplasmódica.

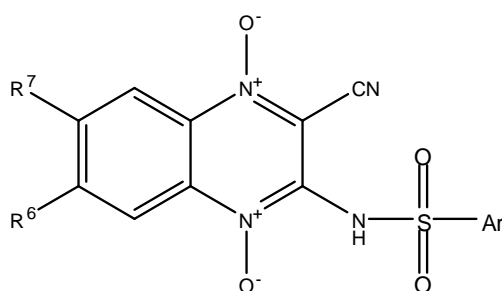
**XIV. ACTIVIDAD  
LEISHMANICIDA**



## 46. Resultados de toxicidad y actividad leishmanicida *in vitro*

Como se ha descrito en el apartado *Material y Métodos*, se ha determinado la actividad leishmanicida *in vitro* y la toxicidad de la totalidad de los compuestos obtenidos cuyos resultados se muestran en las tablas 17-22.

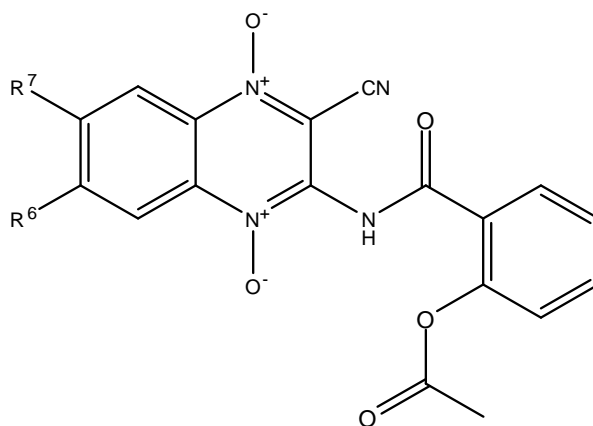
**Tabla 17.** Resultados de toxicidad y actividad leishmanicida de los compuestos de la serie 1.



Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	Ar	CI <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	IS	Índice de Anf B
<b>1.1b</b>	Cl/H	2-naftil	20 ± 1,4	88,6 ± 5,6	4,4	100
<b>1.1c</b>	CH <sub>3</sub> /H	2-naftil	16,3 ± 0,8	>245,6	>15,1	81
<b>1.1f</b>	CH <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub>	2-naftil	>100	ND	ND	>100
<b>1.2b</b>	Cl/H	<i>o</i> -nitrofenil	3,1 ± 0,1	6,8 ± 0,8	2,2	15
<b>1.3a</b>	H/H	<i>p</i> -nitrofenil	86,3 ± 8,5	ND	ND	431
<b>1.3b</b>	Cl/H	<i>p</i> -nitrofenil	2,1 ± 0,1	7,9 ± 0,3	3,8	10
<b>1.3g</b>	Cl/Cl	<i>p</i> -nitrofenil	15,9 ± 1,3	89,1 ± 6,4	5,6	79
<b>Anf B</b>	-	-	0,2 ± 0,01	4,4 ± 0,1	22	1

CI<sub>50</sub>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de amastigotes de *Leishmania amazonensis* ± la desviación estándar. CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica media de los compuestos en macrófagos peritoneales de roedor ± la desviación estándar. IS: índice de selectividad de los compuestos obtenido del cociente de CC<sub>50</sub> de macrófagos peritoneales de ratón y la CI<sub>50</sub> en *Leishmania amazonensis*. ND: no determinado. Anf B: anfotericina B. Índice de Anf B: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la anfotericina B.

**Tabla 18.** Resultados de toxicidad y actividad leishmanicida de los compuestos de la serie 2.

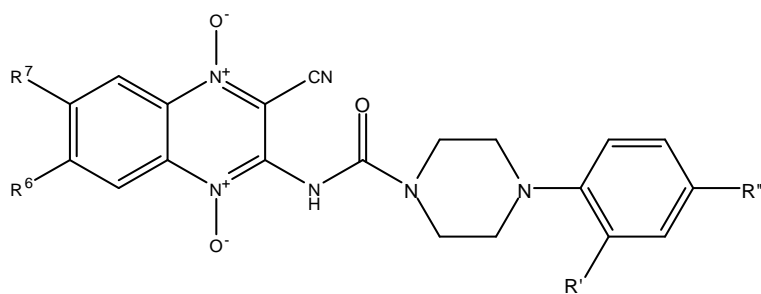


Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	CI <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	IS	Índice de Anf B
<b>2a</b>	H/H	111,8 ± 3,2	ND	ND	559
<b>2b</b>	Cl/H	33,6 ± 1,3	ND	ND	168
<b>2c</b>	CH <sub>3</sub> /H	18,8 ± 0,3	21,7 ± 1,9	1,1	94
<b>2d</b>	CH <sub>3</sub> O/H	42,4 ± 1,7	ND	ND	212
<b>2e</b>	F/H	7,3 ± 0,1	13,6 ± 1,6	1,8	36
<b>2f</b>	CH <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub>	17,6 ± 0,6	12,5 ± 1,1	0,7	88
<b>2h</b>	F/F	14,8 ± 0,1	10,5 ± 0,7	0,7	74
<b>Anf B</b>	-	0,2 ± 0,01	4,4 ± 0,1	22	1

CI<sub>50</sub>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de amastigotes de *Leishmania amazonensis* ± la desviación estándar. CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica media de los compuestos en macrófagos peritoneales de roedor ± la desviación estándar. IS: índice de selectividad de los compuestos obtenido del cociente de CC<sub>50</sub> de macrófagos peritoneales de ratón y la CI<sub>50</sub> en *Leishmania amazonensis*. ND: no determinado. Anf B: anfotericina B. Índice de Anf B: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la anfotericina B.



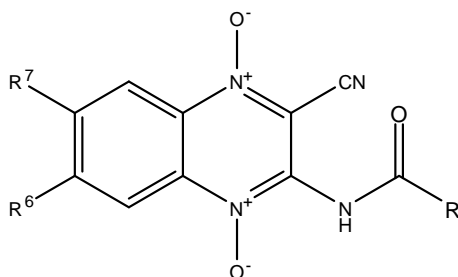
Tabla 19. Resultados de toxicidad y actividad leishmanicida de los compuestos de la serie 3.



Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	R <sup>''</sup> /R <sup>'</sup>	CI <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	IS	Índice de Dox
3.1b	Cl/H	CF <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub>	21,8	7,0	0,3	3
3.1c	CH <sub>3</sub> /H	CF <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub>	36,3	17,7	0,5	6
3.1e	F/H	CF <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub>	41,1	11,0	0,3	6
3.1g	Cl/Cl	CF <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub>	22,7	1,6	0,1	4
3.2b	Cl/H	CF <sub>3</sub> /H	7,6	6,4	0,8	1
3.2c	CH <sub>3</sub> /H	CF <sub>3</sub> /H	23,3	12,1	0,5	4
3.2e	F/H	CF <sub>3</sub> /H	28,8	12,2	0,4	4
3.2g	Cl/Cl	CF <sub>3</sub> /H	5,7	2,2	0,4	1
3.3c	CH <sub>3</sub> /H	F/H	23,0	24,1	1,1	4
3.3e	F/H	F/H	31,3	24,3	0,8	5
3.4b	Cl/H	CH <sub>3</sub> O/H	18,8	47,5	2,5	3
3.4c	CH <sub>3</sub> /H	CH <sub>3</sub> O/H	30,0	183,5	6,1	5
3.4g	Cl/Cl	CH <sub>3</sub> O/H	10,9	14,0	1,3	2
<b>Dox</b>	-	-	6,4	0,4	>10	1

CI<sub>50</sub>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de amastigotes de *Leishmania infantum*. CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica media de los compuestos en células VERO. IS: índice de selectividad de los compuestos obtenido del cociente de CC<sub>50</sub> de células VERO y la CI<sub>50</sub> en *Leishmania infantum*. Dox: doxorubicina. Índice de Dox: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la doxorubicina.

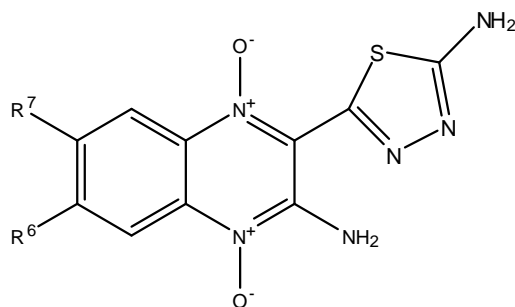
**Tabla 20.** Resultados de toxicidad y actividad leishmanicida de los compuestos de las series 4 y 5.



Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	R'	CI <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> (μM)	IS	Índice de Anf B
<b>4.1a</b>	H/H	ciclopropil	3,59	-	55,11	15,34	17
<b>4.1b</b>	Cl/H	ciclopropil	3,55	-	144,66	40,79	17
<b>4.1c</b>	CH <sub>3</sub> /H	ciclopropil	3,52	-	52,82	15,00	17
<b>4.1d</b>	CH <sub>3</sub> O/H	ciclopropil	3,97	-	145,57	36,70	19
<b>4.2b</b>	Cl/H	ciclopentil	-	14,90	ND	ND	99
<b>4.3b</b>	Cl/H	ciclohexil	2,54	-	249,00	98,05	12
<b>4.3c</b>	CH <sub>3</sub> /H	ciclohexil	4,60	-	240,15	52,19	22
<b>4.3d</b>	CH <sub>3</sub> O/H	ciclohexil	3,45	-	238,51	69,13	16
<b>5.1a</b>	H/H	metil	-	16,60	ND	ND	111
<b>5.2a</b>	H/H	acetil	-	11,90	ND	ND	79
<b>5.2b</b>	Cl/H	acetil	-	4,00	ND	ND	27
<b>5.3b</b>	Cl/H	3-cloropropil	-	0,70	ND	ND	5
<b>Anf B</b>	-	-	0,21	0,15	13,05	62,14	1

CI<sub>50</sub><sup>a</sup>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de amastigotes de *Leishmania infantum*. CI<sub>50</sub><sup>b</sup>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de amastigotes de *Leishmania amazonensis*. CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica media de los compuestos en células VERO. IS: índice de selectividad de los compuestos obtenido del cociente de CC<sub>50</sub> de células VERO y la CI<sub>50</sub> en *Leishmania infantum*. ND: no determinado. Anf B: anfotericina B. Índice de Anf B: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la anfotericina B.

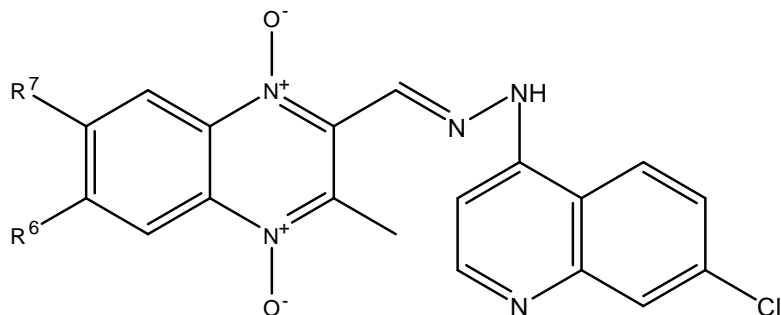
Tabla 21. Resultados de toxicidad y actividad leishmanicida de los compuestos de la serie 6.



Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	CI <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	IS	Índice de Anf B
6a	H/H	95,18	>362,19	>3,81	>450
6b	Cl/H	42,85	246,23	5,75	>200
6c	CH <sub>3</sub> /H	72,84	93,21	1,28	>340
6d	CH <sub>3</sub> O/H	62,92	278,57	4,43	300
6e	F/H	57,74	340,02	>5,89	275
6g	Cl/Cl	36,31	202,12	5,57	>170
Anf B	-	0,21	13,05	62,14	1

CI<sub>50</sub>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de amastigotes de *Leishmania infantum*. CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica media de los compuestos en células VERO. IS: índice de selectividad de los compuestos obtenido del cociente de CC<sub>50</sub> de células VERO y la CI<sub>50</sub> en *Leishmania infantum*. Anf B: anfotericina B. Índice de Anf B: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la anfotericina B.

**Tabla 22.** Resultados de toxicidad y actividad leishmanicida de los compuestos de la serie 7.



Compuesto	R <sup>7</sup> /R <sup>6</sup>	CI <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	IS	Índice de Dox
<b>7a</b>	H/H	559,57	17,77	0,03	87
<b>7b</b>	Cl/H	312,27	194,59	0,62	49
<b>7d</b>	CH <sub>3</sub> O/H	191,26	10,26	0,05	30
<b>Dox</b>	-	6,4	0,4	>10	1

CI<sub>50</sub>: valores medios del ensayo realizado por triplicado, expresados en μM, de la inhibición del 50% del crecimiento celular de amastigotes de *Leishmania infantum*. CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica media de los compuestos en células VERO. IS: índice de selectividad de los compuestos obtenido del cociente de CC<sub>50</sub> de células VERO y la CI<sub>50</sub> en *Leishmania infantum*. Dox: doxorubicina. Índice de Dox: CI<sub>50</sub> del compuesto/CI<sub>50</sub> de la doxorubicina.

## 47. Discusión de la toxicidad y actividad leishmanicida *in vitro*

El estudio del comportamiento de los compuestos de las diferentes series en el ensayo de actividad leishmanicida *in vitro* en *L. amazonensis* y *L. infantum*, ha sido suficiente para comprobar que en todas las series (1-7), son generalmente más activos los derivados con átomos electroatrayentes en posiciones 7 y/o 6 que los derivados que poseen grupos electrodonantes o no se encuentran sustituidos en esas posiciones.

Correspondiente a la **serie 1**, los compuestos **1.2b** y **1.3b** presentan alta actividad, inhibiendo el 50% del crecimiento celular del parásito a una concentración de aproximadamente 3  $\mu\text{M}$ , aunque son de 10 a 15 veces menos activos que la anfotericina B. Con respecto a la relación de la actividad leishmanicida con la posición 7 del anillo de quinoxalina, la ausencia de un átomo electronegativo (Cl) en esta posición produce una caída drástica de dicha actividad (86  $\mu\text{M}$ ). El sustituyente paranitrofenil es también responsable de la actividad en asociación con el átomo de Cl en posición 7, ya que si en dicha posición el sustituyente es un grupo naftil, la actividad disminuye 10 veces. La comparativa basada en los grupos aromáticos situados en posición 3, muestra un descenso de la actividad en este orden: *p*-nitrofenil > *o*-nitrofenil > naftaleno. Ninguno de los compuestos se muestra más selectivo que la anfotericina B utilizada como referencia, aunque se observa que los que poseen sustituyente halogenado en posición 7 y/o 6, resultan más tóxicos.

De entre los compuestos de la **serie 2**, el compuesto **2e** ha sido el más activo frente a *Leishmania amazonensis*, siendo de 2 a 3 veces menos activo que los compuestos **1.2b** y **1.3b**. En relación al sustituyente en posición 7, el grupo metilo y el átomo de flúor son los que peor actividad muestran, disminuyendo ésta cuando dicha posición es ocupada por un átomo de cloro o un grupo metoxi. Con respecto a la toxicidad, los compuestos de esta serie se muestran casi tan tóxicos en macrófagos como en *Leishmania*.

De los compuestos de la **serie 3**, el compuesto **3.2g** presenta una actividad mejor que la doxorubicina utilizada como referencia y **3.2b** y **3.4g** muestran buena actividad. En todos los casos, los compuestos con un átomo de flúor o un grupo metilo en posición 7 son los que peor actividad leishmanicida presentan, mientras que en general, los que presentan átomos de cloro en posiciones 6 y 7 son los de mayor actividad. Todos los compuestos resultan ser tóxicos, y la presencia de átomos electroatrayentes en posición

7 y/o 6 aumenta dicha toxicidad, siendo en general menos tóxicos, los compuestos que presentan grupo metilo en posición 7 y los que poseen un grupo metoxi en posición R''. La presencia de un grupo nitro en posición R' disminuye considerablemente la actividad, mientras que en posición R'' ocurre lo mismo con la presencia de un grupo metoxi en lugar de un grupo trifluorometil. La presencia de un átomo de flúor en posición R'' no mejora la actividad respecto a un grupo trifluorometil.

Con respecto a la **serie 4**, todos los compuestos ensayados frente a *L. infantum*, resultan ser altamente activos, presentando en la mayoría de los casos buenos valores de toxicidad, siendo mejores los que presentan el sustituyente ciclohexil unido al grupo carboxamido de la posición 3 del anillo de quinoxalina, destacando los compuestos **4.3b** y **4.3d** con una toxicidad inferior a la anfotericina B.

Los compuestos de la **serie 5** indican un aumento de la actividad conforme aumenta la longitud de la cadena alifática, resultando ser el compuesto **5.3b** el más activo, inhibiendo el 50% del crecimiento celular del parásito a una concentración (0,7µM) cercana a la de la anfotericina B. Además, como se demuestra observando la actividad de los compuestos **5.2b** y **5.3b**, la presencia de un átomo de cloro en posición 7, aumenta considerablemente la actividad.

Como se ha comentado anteriormente, debido a las dificultades encontradas en la ruta sintética se han estimado los compuestos intermedios como compuestos finales en el caso de la **serie 6**. Los compuestos finales han presentado baja o nula actividad, y ser tóxicos, aunque los compuestos con átomos electroatrayentes en posición 7 y/o 6 presentan una mayor actividad leishmanicida y una menor toxicidad.

Los compuestos de la **serie 7** se han mostrado inactivos, además de ser tóxicos frente a *L. infantum*, aunque la presencia de un sustituyente halogenado en posición 7 aumenta la selectividad.

El compuesto que ha presentado mayor actividad leishmanicida frente a *Leishmania amazonensis* ha sido el compuesto **5.3b**, mientras que frente a *Leishmania infantum*, ha sido el compuesto **4.3b**. En base a los resultados, la serie que mejor actividad ha mostrado ha sido la serie que presenta un ciclo unido al grupo carboxamido situado en la posición 3 del anillo de quinoxalina (serie 4), ya que todos ellos han resultado ser notablemente activos. De hecho, dos de ellos (**4.3b** y **4.3d**), han presentado

mayor selectividad incluso que el compuesto de referencia (anfotericina B). Además, de los once compuestos con interesante actividad leishmanicida, seis de ellos presentan en posición 7 un átomo de cloro.

## 48. Discusión de la selectividad de los compuestos por las actividades evaluadas

En función de los resultados de actividad *in vitro* obtenidos por los compuestos evaluados, podemos inferir la selectividad de las series diseñadas.

En relación a los compuestos de la **serie 1**, ninguno ha mostrado notable actividad frente a *Plasmodium falciparum*, aunque dos de ellos (**1.2b** y **1.3b**) con un átomo de cloro en posición 7 y un grupo nitrofenil unido a la sulfonamida en posición 3, sí que lo han hecho frente a *Leishmania amazonensis*.

De los compuestos pertenecientes a la **serie 2**, ninguno ha mostrado ser altamente activo frente a malaria o leishmaniasis, aunque el compuesto **2e** ha mostrado interesante actividad en ambos casos.

Con respecto a la **serie 3**, el compuesto con dos átomos de cloro en posiciones 6 y 7 (**3.2g**), presenta actividad superior a la doxorrubicina frente a *Leishmania infantum*, mostrando el resto de compuestos actividad moderada, baja o nula frente a leishmaniasis, al igual que la totalidad de ellos frente a *Plasmodium falciparum*.

La totalidad de los compuestos de la **serie 4** ensayados frente a *Leishmania infantum* han resultado ser notablemente activos, mientras que frente a *Plasmodium falciparum* solo el compuesto **4.2b** ha resultado serlo, ya que el resto presentan moderada actividad. En relación a la selectividad frente a *Leishmania infantum*, los compuestos **4.3b** y **4.3d** presentan un índice de selectividad superior a la anfotericina B.

En la **serie 5**, el compuesto **5.2b** ha resultado ser altamente activo tanto en *Plasmodium falciparum* como en *Leishmania amazonensis*, y el compuesto **5.3b** ha resultado ser el más activo frente a *Leishmania amazonensis*. El resto de compuestos han presentado buena actividad tanto en *Leishmania amazonensis* como en *Plasmodium falciparum*.

Debido a la imposibilidad de poder sintetizar los compuestos finales de la **serie 6**, los compuestos sintetizados no han servido para evaluar el efecto de los grupos situados en posición 2 y se han mostrado inactivos en ambas actividades.



De entre todos los compuestos, **7b** y **7d** correspondientes a la **serie 7**, son los que han mostrado mayor actividad antiplasmódica, y han sido elegidos como líderes en el diseño de nuevos compuestos frente a *Plasmodium falciparum*. Ninguno de los compuestos de esta serie se ha mostrado activo frente a *Leishmania infantum*.



# **XV. ENSAYOS COMPUTACIONALES**



## 49. Resultados y discusión de los ensayos computacionales

Los resultados obtenidos en los ensayos computacionales de los compuestos de las series 1 y 2, se recogen en la siguiente tabla (tabla 22):

**Tabla 22.** Propiedades físico-químicas de los compuestos de las series 1 y 2.

ID	%ABS <sup>a</sup>	TPSA	<i>n</i> -RT	Peso	miLog <i>P</i>	Descriptor de	<i>n</i> -	<i>n</i> -	Violaciones de Lipinski
		(Å)		Molecular		lipoficidad	OHNH	NO	
		≤140		<500		(Σπ) <sup>b</sup>	donantes	aceptores	
							≤5	≤10	≤1
<b>1.1b</b>	67.28	120.9	3	426.84	1.19	0.65	1	8	0
<b>1.1c</b>	67.27	120.8	3	406.42	0.96	0.43	1	8	0
<b>1.1f</b>	67.27	120.8	3	420.45	1.34	0.80	1	8	0
<b>1.2b</b>	51.48	166.7	4	421.79	-0.08	0.65	1	11	1
<b>1.3b</b>	51.48	166.7	4	421.79	-0.03	0.65	1	11	1
<b>1.3g</b>	51.48	166.7	4	456.22	0.57	1.25	1	11	1
<b>1.3a</b>	51.48	166.7	4	387.33	-0.68	0	1	11	1
<b>2a</b>	69.98	113.1	4	364.32	-0.47	0	1	9	0
<b>2b</b>	64.11	130.1	4	398.76	0.18	0.65	1	9	0
<b>2c</b>	64.11	130.1	4	378.34	-0.04	0.43	1	9	0
<b>2d</b>	60.94	139.3	5	394.34	-0.43	0.04	1	10	0
<b>2h</b>	64.11	130.1	4	400.29	-0.23	0.24	1	9	0
<b>2f</b>	64.11	130.1	4	392.37	0.33	0.80	1	9	0
<b>2e</b>	64.11	130.1	4	396.33	-0.33	0.14	1	9	0

<sup>a</sup> %ABS, porcentaje de absorción, calculado por: %ABS = 109 – (0.345 x TPSA); TPSA, área topológica de superficie polar; *n*-RT, número de enlaces rotables; miLog*P*, logaritmo del coeficiente de partición de los compuestos entre *n*-octanol y agua. <sup>b</sup> Fragmentos hidrofílicos-lipofílicos determinados por cambios en R<sup>7</sup> y R<sup>6</sup>, calculado por la suma de Σπ valores, utilizando los compuestos 7 y 8, y el método del fragmento constante como referencia.<sup>182</sup>

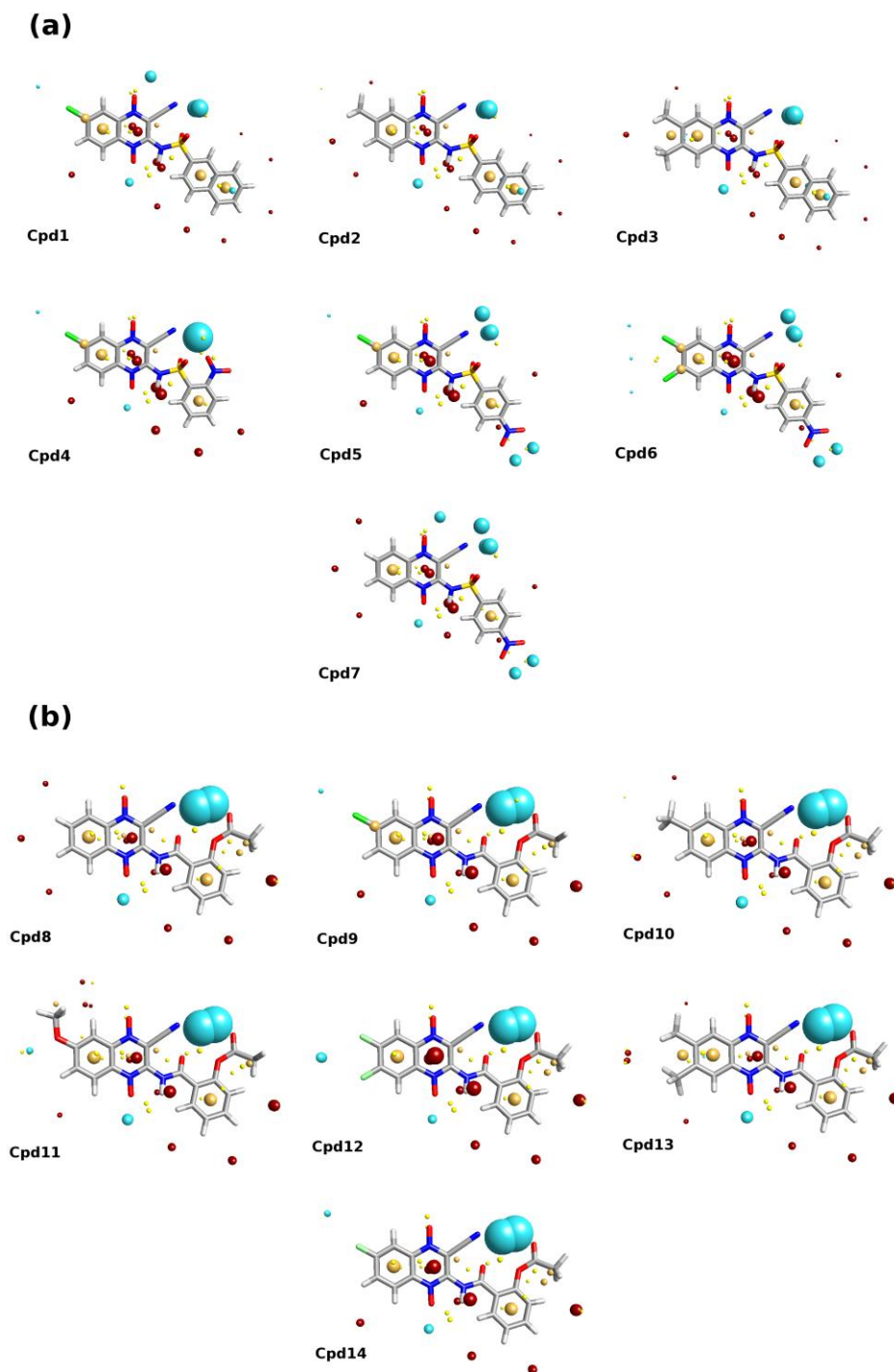
Los compuestos más activos encontrados de las series 1 y 2 en los ensayos frente a malaria y leishmania (compuestos **1.2b**, **1.3b**, **2b** y **2e**) presentan porcentajes medios de absorción intestinal, con valores de alrededor del 58%, y un excelente rango de *n*-RT, de 3 a 4.<sup>183</sup> Ninguno de estos compuestos viola ninguna regla de Lipinski, una

característica importante a tener en cuenta en el futuro desarrollo de fármacos.

Las correlaciones entre los descriptores moleculares como el peso molecular, LogP y las actividades de los compuestos de las series 1 y 2 han sido calculadas. Los valores de correlación de Pearson, que son útiles para medir la asociación entre dos variables, han sido calculadas entre las actividades biológicas que aparecen en las tablas 11, 12, 17 y 18, y las propiedades fisicoquímicas de la tabla 22. En contraste a los resultados encontrados previamente<sup>113,128</sup>, cuyos derivados solo correlacionan entre LogP y las actividades biológicas, en este caso, un elemento importante para la actividad ha sido también conferido por el peso molecular de los derivados, un parámetro importante que está directamente relacionado con el tamaño de la molécula, útil para ilustrar la influencia de las características de la forma y estructura de una molécula. En la segunda serie, los valores obtenidos muestran una correlación entre el peso molecular y las actividades leishmanicida y antiplasmódica respectivamente, expresado como Log (1/CI<sub>50</sub>), en el que los valores exponencialmente altos indican una potencia más alta (el logaritmo inverso de la CI<sub>50</sub> es generalmente utilizado en estudios cuantitativos de relación estructura-actividad). Los compuestos de la segunda serie siguen una relación lineal positiva ( $r = 0.47$  para malaria,  $r = 0.64$  para leishmania e indeterminado para la citotoxicidad en macrófagos peritoneales), mientras que la primera serie sigue una relación lineal negativa entre LogP y la actividad antimalárica ( $r = -0.56$ ), también expresada como Log (1/CI<sub>50</sub>).

Se observa que un átomo de Cl (**2b**) o uno de F (**2e**) en posición 7 incrementa la actividad entre 4 y 7 veces cuando son comparados con un H o un CH<sub>3</sub> en la misma posición. Como se muestra en la figura 60b, la posición de un átomo electronegativo (F, Cl u O), representado como un campo azul, es claramente importante para que los átomos actúen como posibles donadores de puentes de hidrógeno. Esto contrasta con los grupos CH<sub>3</sub> e H, que proyectan regiones hidrofóbicas (representadas como campos dorados).

Desde un punto de vista de distribución espacial, según la figura 60, esto podría significar que una fuerte concentración de átomos electronegativos (potenciales aceptores de puentes de hidrógeno) en un mismo plano es una buena característica de los compuestos de la serie 2. Por lo tanto, se puede decir que los grupos *o*-nitrofenil, *p*-nitrofenil y 2-naftil disminuyen la actividad de los compuestos de la serie 1.



**Figura 60.** Representación gráfica de la relación estructura-actividad de los compuestos de la serie 1 (a) y los compuestos de la serie 2 (b). Los campos aparecen coloreados de la siguiente manera: azul: campos negativos (que pueden interactuar con campos positivos/donadores de puentes de hidrógeno en la proteína), rojo: campos positivos (que pueden interactuar con campos negativos/aceptores de puentes de hidrógeno en la proteína), amarillo: campos de superficie de van der Waals (describiendo posible superficie/interacciones de vdW), o dorado: campos hidrofóbicos (describen regiones con alta polarizabilidad/hidrofobicidad). Los compuestos con asignación numérica en esta figura se corresponden con los de este trabajo de la siguiente manera: compuesto 1.1b (1), compuesto 1.1c (2), compuesto 1.1f (3), compuesto 1.2b (4), compuesto 1.3b (5), compuesto 1.3g (6), compuesto 1.3a (7), compuesto 2a (8), compuesto 2b (9), compuesto 2c (10), compuesto 2d (11), compuesto 2h (12), compuesto 2f (13), compuesto 2e (14).





# **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo ha sido la obtención de nuevos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina como agentes antimaláricos y leishmanicidas.

1. Se han diseñado, sintetizado y caracterizado cuarenta y ocho nuevos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina. Dichos compuestos han sido evaluados frente a diferentes cepas de *Plasmodium falciparum* en la Universidad de Antioquía en Medellín (Colombia) y por GlaxoSmithKline en Tres Cantos (Madrid), y frente a diferentes especies de *Leishmania (amazonensis e infantum)* en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Perú) y en la Universidad de Toulouse (Francia).
2. Gracias a la optimización de un método de síntesis asistida por microondas previamente empleado por nuestro grupo, se obtuvieron los derivados pertenecientes a la serie 7. El método optimizado ha permitido obtener buenos rendimientos, con bajos tiempos de reacción y pequeños volúmenes de disolvente empleado.
3. Se han obtenido quince nuevos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina que han mostrado buena actividad *in vitro* frente a diferentes cepas de *Plasmodium falciparum*. Cuatro de ellos, **4.2b**, **5.2b**, **7b** y **7d**, han resultado ser notablemente activos mostrando valores de  $CI_{50}$  inferiores a 5  $\mu$ M.
4. Se han obtenido ocho nuevos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina que han mostrado buena actividad *in vitro* frente a *Leishmania amazonensis*. Cuatro de ellos, **1.2b**, **1.3b**, **5.2b** y **5.3b**, han presentado alta actividad con valores de  $CI_{50}$  inferiores a 5  $\mu$ M.
5. Se han obtenido diez nuevos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina que han presentado buena actividad *in vitro* frente a *Leishmania infantum*. Siete de ellos, **4.1a**, **4.1b**, **4.1c**, **4.1d**, **4.3b**, **4.3c** y **4.3d**, han resultado ser altamente activos.

6. Se han obtenido dos compuestos, **4.3b** y **4.3d**, con un índice de selectividad frente a *Leishmania infantum* superior al de la anfotericina B, compuesto utilizado en los tratamientos actuales frente al parásito.
7. Debido a los buenos resultados de actividad *in vitro* y de selectividad en leishmaniasis de los compuestos **4.3b** y **4.3d**, dichos compuestos han sido seleccionados como líderes para el futuro diseño de compuestos frente a dicha enfermedad.
8. Debido a los notables resultados de actividad *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum* de los compuestos híbridos de cloroquina con quinoxalina, dichos compuestos han sido seleccionados como líderes en el diseño de una serie de compuestos que actualmente se encuentra en la fase de síntesis frente a malaria.
9. Los estudios computacionales ADME de los compuestos de las series 1 y 2, realizados en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Perú), muestran que todos los compuestos de dichas series cumplen las reglas de Lipinski, mostrando propiedades “drug-likeness” que los hace potencialmente útiles como base para el futuro desarrollo de fármacos frente a malaria y leishmaniasis.
10. Los resultados obtenidos indican desde un punto de vista de relación estructura-actividad que la sustitución en posición 7 y/o 6 del anillo de quinoxalina por un grupo electroatrayente, especialmente el átomo de cloro, potencia la actividad antimalárica y leishmanicida.
11. El aumento de longitud de la cadena alifática unida al grupo carboxamido situado en la posición 3 del anillo mejora tanto la actividad antimalárica como leishmanicida.
12. En relación a la actividad antiplasmódica, el estudio de relación estructura-actividad muestra que los mejores sustituyentes en posición 3 del doble anillo de quinoxalina, presentan una cadena alifática o un ciclopentano unidos a un grupo carboxamido.
13. Con respecto a la actividad leishmanicida, el estudio de relación estructura-actividad muestra que los mejores sustituyentes en posición 3 del doble anillo de quinoxalina son los que presentan un ciclo unido al grupo carboxamido.

# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Croft, S. L. "Neglected diseases: progress in drug development". *Current Opinion in Investigational Drugs*. **2007**, 8, 103-104.
2. Caines, K. "GHP study paper 4: Global health partnerships and neglected diseases". *DFID Health Resource*, London, UK.
3. Fehr, A., Thurmann, P., Razum, O. "Drug development for neglected diseases: a public health challenge". *Tropical Medicine and International Health*. **2006**, 11, 1335-1338.
4. Troullier, P., Olliaro, P., Torreele, E., Orbinski, J., Laing, R., Ford, N. "Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure". *Lancet*. **2002**, 359, 2188-2194.
5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy> Accedido el 23 de Septiembre de 2012
6. Disponible en: [http://www.malariasite.com/malaria/history\\_literature.htm](http://www.malariasite.com/malaria/history_literature.htm) Accedido el 23 de Septiembre de 2012
7. Adak, T., Sharma, V.P., Orlov, V.S. "Studies on the *Plasmodium vivax* relapse pattern in Delhi, India". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **1998**, 59, 175-179.
8. Wernsdorfer, W. H., McGregor, I. "Malaria: principles and practice of malariology". *Churchill-Livingstone*. **1988**, Edinburgh, UK.
9. Disponible en: <http://www.medicinam.com> Accedido el 27 de Septiembre de 2012
10. Sachs, J., Malaney, P. "The economic and social burden of malaria". *Nature*. **2002**, 415, 680-685.
11. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/es/> Accedido el 29 de Septiembre de 2012
12. Disponible en: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2009](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009) Accedido el 1 de Octubre de 2012
13. Azira, N.M.S., Zairi, N.Z., Amry, A.R., Zeehaida, M. "Case series of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infection in a tertiary teaching hospital". *Tropical Biomedicine*. **2012**, 29, 398-404.
14. Disponible en: <http://www.tinymosquito.com/anopheles.html> Accedido el 2 de Octubre de 2012
15. Disponible en: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> Accedido el 2 de Octubre de 2012

16. Disponible en: [www.immuninfo.ru](http://www.immuninfo.ru) Accedido el 3 de Octubre de 2012
17. Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., Prabhu, R. M. "Clinical review: severe malaria". *Critical care*. **2003**, 7, 315-323.
18. Dondorp, A. M., Kager, P. A., Vreeken, J., White, N. J. "Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria". *Parasitology Today*. **2000**, 16, 228-232.
19. Barcia, J. J. "The Giemsa stain: its history and applications". *International Journal of Surgical Pathology*. **2007**, 15, 292-296.
20. Pattanasin, S., Proux, S., Chompasuk, D., Luwiradaj, K., Jacquier, P., Looareesuwan, S., Nosten, F. "Evaluation of a new *Plasmodium* lactate dehydrogenase assay (OptiMAL-IT) for the detection of malaria". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **2003**, 97, 672-674.
21. Roberts, D. R., Manguin, S., Mouchet, J. "DDT house spraying and re-emerging malaria". *Lancet*. **2000**, 356, 330-332.
22. Chen, L. H., Keystone, J. S. "New strategies for the prevention of malaria in travelers". *Infectious Disease Clinics of North America*. **2005**, 19, 185-210.
23. Franco-Paredes, C., Santos-Preciado, J. I. "Problem pathogens: prevention of malaria in travelers". *Lancet Infectious Diseases*. **2006**, 6, 139-149.
24. Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H., Schlitzer, M. "New antimalarial drugs". *Angewandte Chemie-International edition*. **2003**, 42, 5274-5293.
25. Gensini, G. F., Conti, A. A., Lippi, D. "The contributions of Paul Ehrlich to infectious disease". *Journal of Infection*. **2007**, 54, 221-224.
26. Taylor, W. R. J., White, N. J. "Antimalarial drug toxicity- A review". *Drug safety*. **2004**, 27, 25-61.
27. Vangapandu, S., Jain, M., Kaur, K., Patil, P., Patel, S. R., Jain, R. "Recent advances in antimalarial drug development". *Medicinal Research Reviews*. **2007**, 27, 65-107.
28. Canfield, C. J., Pudney, M., Gutteridge, W. E. "Interactions of atavaquone with other antimalarial-drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro". *Experimental Parasitology*. **1995**, 80, 373-381.
29. Mabeza, G. F., Loyevsky, M., Gordeuk, V. R., Weiss, G. "Iron chelation therapy for malaria: a review". *Pharmacology & Therapeutics*. **1999**, 81, 53-75.
30. Gademann, K., Kobyliska, J. "Antimalarial natural products of marine and freshwater origin". *Chemical Record*. **2009**, 9, 187-198.



31. Disponible en: [http://dna.kdna.ucla.edu/parasite\\_course-old/leish\\_files/introduction1.htm](http://dna.kdna.ucla.edu/parasite_course-old/leish_files/introduction1.htm) Accedido el 7 de Octubre de 2012
32. Noyes, H. A., Moro, D. A., Chance, M. L., Ellis, J. T. "Evidence for a neotropical origin of *Leishmania*". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **2000**, 95, 575-578.
33. Kerr, S. F. "Palaeartic origin of *Leishmania*". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **1995**, 95, 75-80.
34. Disponible en: [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)
35. Disponible en: [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html)
36. Bates, P. A. "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies". *International Journal for Parasitology*. **2007**, 37, 1097-1106.
37. Vannier-Santos, M. A., Martiny, A. "Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading". *Current Pharmaceutical Design*. **2002**, 8, 297-318.
38. Disponible en: [www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)
39. Disponible en: <http://biosalud.saber.ula.ve/db/ssalud/edocs/articulos/Leishmaniasis.pdf>
40. Ribeiro-Gomes, F. L., Otero, A. C. "Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection". *Journal of Immunology*. **2004**, 172, 4454-4462.
41. Courret, N., Frehel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E. "Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites". *Journal of Cell Science*. **2002**, 115, 2303-2316.
42. Rittig, M. G., Schroppel, K., Seack, K. H., Sander, U., Maridonneau-Parini, I., Solbach, W., Bogdan, C. "Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells". *Infection and Immunity*. **1998**, 66, 4331-4339.
43. Disponible en: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
44. Herwaldt, B. "Leishmaniasis". *Harrison's Principles of International Medicine*, 14<sup>th</sup> Edition. **1998**.

45. Botero, D., Restrepo, M. "Parasitosis Humanas". *Corporación para Investigaciones Biológicas*, 2ª Edición, Colombia. **1992**.
46. Grevelink, S., Lerner, E. "Leishmaniasis". *Journal of the American Academy of Dermatology*. **1996**, 34, 257-270.
47. Loiseau, P. M., Bories, C. "Mechanisms of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators". *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2006**, 6, 539-550.
48. Croft, S. L., Neal, R.A., Pendergast, W., Chan, J. H. "The activity of alkyl phosphocholines and related derivates against *Leishmania donovani*". *Biochemical Pharmacology*. **1987**, 36, 2633-2636.
49. Ramos, H., Valdivieso, E., Gamargo, M., Dagger, F., Cohen, B. E. "Amphotericin B kills unicelular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions". *Journal of Membrane Biology*. **1996**, 152, 65-75.
50. Sundar, S., Rai, M. "Advances in the treatment of leishmaniasis". *Current Opinion in Infectious Diseases*. **2002**, 15, 593-598.
51. Campos-Munoz, L., Quesada-Cortes, A. "Leishmania braziliensis: report of a pediatric imported case with response to liposomal amphotericin B". *Actas Dermosifiliográficas*. **2007**, 98, 42-44.
52. Verma, N. K., singh, G. "Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction". *Experimental Parasitology*. **2007**, 116, 1-13.
53. Cortazar, T. M., Coombs, G. H., Walker, J. "*Leishmania panamensis*: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine". *Experimental Parasitology*. **2007**, 116, 475-482.
54. Maarouf, M., Lawrence, F. "Biochemical alterations in paramomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes". *Parasitology Research*. **1997**, 83, 198-202.
55. Alzate, J. F., Arias, A., Mollinedo, F., Rico, E., de la Iglesia-Vicente, J., Jimenez-Ruiz, A. "Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania*

- infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk”. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. **2008**, *52*, 3779-3782.
56. Disponibile en:  
[http://www.who.int/leishmaniasis/research/978\\_92\\_4\\_12\\_949\\_6\\_Annex6.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/research/978_92_4_12_949_6_Annex6.pdf)
57. Lima, L. M., Barreiro, E. J. “Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design”. *Current Medicinal Chemistry*. **2005**, *12*, 23-49.
58. Carta, A., Loriga, M., Piras, S., Paglietti, G., La Colla, P., Busonera, B., Collu, G., Loddo, R. “Synthesis of variously substituted 3-phenoxyethyl quinoxalin-2-ones and quinoxalines capable to potentiate *in vitro* the antiproliferative activity of anticancer drugs in multi-drug resistant cell lines”. *Medicinal Chemistry*. **2006**, *2*, 1-12.
59. Alleca, S., Corona, P., Loriga, M., Paglietti, G., Loddo, R., Mascia, V., Busonera, B., La Colla, P. “Quinoxaline chemistry. Part 16. 4-substituted anilino and 4 substituted phenoxyethyl pyrrolo[1,2-a]quinoxalines and N-[4-(pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-il)amino and hydroxyethyl]benzoyl glutamates. Synthesis and evaluation of *in vitro* biological activity”. *Il Farmaco*. **2003**, *58*, 639-650.
60. Waring, M., Ben-Hadda, T., Kotchevar, A., Ramdani, A., Touzani, T., Elkadiri, S., Hakkou, A., Bouakka, M., Ellis, T. “2,3-Bifunctionalized quinoxalines: synthesis, DNA interactions and evaluation of anticancer, anti-tuberculosis and antifungal activity”. *Molecules*. **2002**, *7*, 641-656.
61. Mielcke, T. R., Mascarello, A., Filippi-Chiela, E., Zanin, R. F., Lenz, G., Leal, P. C., Chirardia, L. C., Yunes, R. A., Nunes, R. J., Battastini, A., Morrone, F. B. “Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on *in vitro* glioma cell proliferation”. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2012**, *48*, 255-264.
62. Undevia, S., Innocenti, F., Ramirez, J. “A phase I and pharmacokinetic study of the quinoxaline antitumor Agent R(+)-XK469 in patients with advanced solid tumours”. *European Journal of Cancer*. **2008**, *44*, 1684-1692.
63. Noolvi, M. N., Patel, H., Bhardwaj, V. “Synthesis and *in vitro* antitumor activity of substituted quinazoline and quinoxaline derivatives: search for anticancer agents”. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, *46*, 2327-2346.
64. Carta, A., Piras, S., Loriga, G., Paglietti, G. “Chemistry, biological properties and SAR analysis of quinoxalinones”. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **2006**, *6*, 1179-1200.

65. Carta, A., Loriga, M., Zanetti, S., Sechi, L. "Quinoxalin-2-ones: Part 5. Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-alkyl-, 3-halomethyl- and 3-carboxyethylquinoxaline-2-ones variously substituted on the benzo-moiety". *Il Farmaco*. **2003**, 58, 1251-1255.
66. Carta, A., Paglietti, G., Nikookar, M. E. R., Sanna, P., Sechi, L., Zanetti, S. "Novel substituted quinoxaline 1,4-dioxides with in vitro antimycobacterial and anticandida activity". *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2002**, 37, 355-366.
67. Carta, A., Sanna, P., Loriga, M., Setzu, M. G., La Colla, P., Loddo, R. "Synthesis and evaluation for biological activity of 3-alkyl and 3-halogenoalkyl-quinoxalin-2-ones variously substituted. Part 4". *Il Farmaco*. **2002**, 57, 19-25.
68. Willardsen, J. A., Dudley, D. A., Cody, W. L., Chi, L., Mc Clanahan, T. B., Mertz, T. E., Potoczak, R. E., Narasimhan, L. S., Holland, D. R., Rapundalo, S. T., Edmunds, J. "Design, synthesis and biological activity of potent inhibitors of blood coagulation factor Xa". *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, 47, 4089-4099.
69. Ries, U. J., Priepke, H. W. M., Huel, N. H., Handschuh, S., Mihm, G., Stassen, J. M., Wienen, W., Nar, H. "Heterocyclic thrombin inhibitors. Part 2: quinoxalinone derivatives as novel, potent antithrobotic agents". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2003**, 13, 2297-2302.
70. Gomtsyan, A., Bayburt, E. K., Schmidt, R. S., Zhu Zheng, G., Perner, R. J., Didomenico, S., Koenig, J. R., Turner, S., Jinkerson, T., Drizin, I., Hannick, S. M., Macri, B. S., Mc Donald, H. A., Honore, P., Wismer, C. T., Marsh, K. C., Wetter, J., Stewart, K. D., Oie, T., Jarvis, M. F., Surowy, C. S., Faltynek, C. R., Lee, C. H. "Novel transient receptor potential vanilloid 1 receptor antagonists for the treatment of pain: structure-activity relationships for ureas with quinoline, isoquinoline, quinzazoline, phtalazine, quinoxaline and cinnoline moieties". *Journal of Medicinal Chemistry*. **2005**, 48, 744-752.
71. Abu-Hashem, A., Gouda, M., Badria, F. "Synthesis of some new pyrimido[2',1':2,3]thiazolo[4,5-b]quinoxaline derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents". *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, 45, 1976-1981.
72. Hossain, M. M., Muhib, M. H., Mia, M. R., Kumar, S., Wadud, S. A., Savelli, F. "In vitro antioxidant potential study of some synthetic quinoxalines". *Bangladesh Medical Research Council Bulletin*. **2012**, 38, 47-50.

73. Saari, R., Torma, J. C., Nevalainen, T. "Microwave-assisted synthesis of quinoline, isoquinoline, quinoxaline and quinazoline derivatives as CB2 receptor agonists". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2011**, *19*, 939-950.
74. Burguete, A., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Ancizu, S., Villar, R., Solano, B., Moreno, E., Torres, E., Perez-Silanes, S., Aldana, I., Monge, A. "Synthesis and biological evaluation of new quinoxaline derivatives as antioxidant and anti-inflammatory agents". *Chemical Biology and Drug Design*. **2011**, *77*, 255-267.
75. Burguete, A., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Villar, R., Vicente, E., Solano, B., Ancizu, S., Perez-Silanes, S., Aldana, I., Monge, A. "Synthesis and anti-inflammatory/antioxidant activities of some new ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives and of their 4,5-dihydro-(1H)-pyrazole analogues". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2007**, *17*, 6439-6443.
76. Olayiwola, G., Obafemi, C. A., Taiwo, F. O. Synthesis and neuropharmacological activity of some quinoxalinone derivatives. *African Journal of Biotechnology*. **2007**, *6*, 777-786.
77. Tang, A. H., Franklin, S. R., Hmes, C. S., Ho, P. M. "Behavioral effects of U-78875, a quinoxaline anxiolytic with potent benzodiazepine antagonist activity". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **1991**, *259*, 254.
78. Von Voigtlander, P. F., Collin, R. J., Watien, F., Christensen, A., Jensen, L. H., Honoré, T. "The discovery of panadiplon, a benzodiazepine antagonist anxiolytic". *Pharmacologist*. **1990**, *32*, 136.
79. Honoré, T., Davies, S. N., Drejer, J., Fletcher, E. J., Jacobsen, P., Lodge, D., Nielsen, F. E. "Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists". *Science*. **1988**, *241*, 701-703.
80. Patel, M., Mc Hugh, R. J., Cordova, B. C., Klabe, R. M., Erickson-Viitanen, S., Trainor, G. L., Rodgers, J. D. "Synthesis and evaluation of quinoxalinones as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2000**, *10*, 1729-1731.
81. Kleim, J. P., Winters, M., Dunkler, A., Suarez, J. R., Riess, G., Winkler, I., Balzarini, J., Oette, D., Merigan, T. C. "Antiviral activity of the human immunodeficiency virus type 1-specific nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor HBY 097 alone and in combination with Zidvudine in a Phase II study". *Journal of Infectious Diseases*. **1999**, *179*, 709-713.

82. Kleim, J. P., Bender, R., Billhard, U. M., Meischner, C., Reiss, G., Rösner, M., Winkler, I., Paessens, A. "Activity of a novel quinoxaline derivative against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and viral replication". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1993**, *37*, 1659-1663.
83. Carta, A., Corona, P., Loriga, M. "Quinoxaline 1,4-dioxide: A versatile scaffold endowed with manifold activities". *Current Medicinal Chemistry*. **2005**, *12*, 2559-2272.
84. Amin, K. M., Ismail, M. F., Noaman, E., Soliman, D. H., Ammar, Y. A. "New quinoxaline 1,4-di-*N*-oxides. Part 1: Hypoxia-selective cytotoxins and anticancer agents derived from quinoxaline 1,4-di-*N*-oxides". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2006**, *14*, 6917-6923.
85. FR196640971331 19640417. 1965 1964-04-17.
86. Ganley, B., Chowdhury, G., Bhansali, J., Daniels, J. S., Gates, K. S. "Redox-activated, hypoxia-selective DNA cleavage by quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2001**, *9*, 2395-2401.
87. Carta, A., Loriga, M., Paglietti, G., Mattana, A., Fiori, P. L., Mollicoti, P., Sechi, L., Zanetti, S. "Synthesis, anti-mycobacterial, anti-trichosomas and anti-candida *in vitro* activities of 2-substituted-6,7-difluoro-3-methylquinoxaline 1,4-dioxides". *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, *39*, 195-203.
88. Loriga, M., Nuvole, A., Paglietti, G., Fadda, G., Zanetti, S. "2-Phenyl-6(7)-*R* substituted quinoxalines *N*-oxides. Synthesis, structure elucidation and antimicrobial activity". *European Journal of Medicinal Chemistry*. **1990**, *25*, 527-532.
89. Glazer, E., Chappel, L. "Pyridoquinoxaline *N*-oxides. 1. A new class of antitrichomonal agents". *Journal of Medicinal Chemistry*. **1982**, *25*, 766-769.
90. US19700006550 19700128; US19690843775 19690722; US19690843810 196907221971 1969-07-22.
91. Kurt, L., Ulrich, E., inventors. "2-isothiuronium-methyl-3-carboxylic acid amido-quinoxaline-1,4-di-*N*-oxide halides as antibacterial agents and pharmaceutical compositions comprising said oxides". DE1967F053669 19671004. 1972 67-10-04.
92. Kurt, L. Ulrich, E., inventors. "Preparation of quinoxaline-di-*N*-oxides". C07D241/52 PATENT us19700024422 19700407. 1970-04-07.

93. Abu El-Haj, M. J., inventor. "Verfahren zur herstellung von 2chinoxalincarboxamid-1,4-dioxiden". US19720249373 19720501. 1973 1972-05-01.
94. "Werkwijze voor de bereiding van chinoxaline 1,4-dioxyden". US19740437132 19740128. 1975 1974-01-28.
95. Cronin, T., Richardson, K., inventors. "Hydroxyalkyl esters of quinoxaline di-*N*-oxide-2-carboxylic acid". US 19710135792 19710420; US19700020841 19700318. 1974.
96. Aguirre, G., Cerecetto, H., Di Maio, R., Gonzalez, M., Montoya, M. E., Jaso, A., Zarranz, B., Ortega, M. A., Aldana, I., Monge, A. "Quinoxaline *N,N*-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure-activity relationships". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2004**, *14*, 3835-3839.
97. Urquiola, C., Vieites, M., Aguirre, G., Marin, A., Solano, B., Arrambide, G., Noblía, P., Lavaggi, M. L., Torre, M. H., Gonzalez, M., Monge, A., Gambino, D., Cerecetto, H. "Improving anti-trypanosomal activity of 3-aminoquinoxaline-2-carbonitrile *N*-1,*N*-4-dioxide derivatives by complexation with vanadium". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2006**, *14*, 5503-5509.
98. Deel, P., inventor. "Process for the preparation of new derivatives of quinoxaline di-*N*-oxide, and their use as supplementary-feed agent having a growth-promoting action". CH19720013032 19720905. 1977.
99. Lepant, M., Laruelle, C., inventors. "New quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives, process for their preparation and their use in human and veterinary therapeutics". FR19850000777 19850121. 1986.
100. Monge, A., Palop, J. A., del Castillo, J. C., Calderó, J. M., Roca, J., Romero, G., del Río, J., Lasheras, B. "Novel antagonists of 5-HT<sub>3</sub> receptors. Synthesis and biological evaluation of piperazinylquinoxaline derivatives". *Journal of Medicinal Chemistry*. **1993**, *36*, 2745-2750.
101. Ortega, M. A., Montoya, M. E., Zarranz, B., Jaso, A., Aldana, I., Lecrec, S., Meijer, L., Monge, A. "Pyrazolo[3,4-*b*]quinoxalines. A new class of cyclin-dependent kinases inhibitors". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2002**, *10*, 2177-2184.
102. Monge, A., Palop, J. A., Urbasos, I., Fernandez Alvarez, E. "New quinoxaline and pyrimido[4,5-*b*]quinoxaline derivatives- potential

- antihypertensive and blood-platelet antiaggregating agents". *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **1989**, *26*, 1623-1626.
103. Ancizu, S., Moreno, E., Solano, B., Villar, R., Burguete, A., Torres, E., Perez-Silanes, S., Aldana, I., Monge, A. "New 3-methylquinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-*N*-oxide derivatives as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2010**, *18*, 2713-2719.
104. Moreno, E., Ancizu, S., Perez-Silanes, S., Torres, E., Aldana, I., Monge, A. "Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-*N*-oxide derivatives". *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, *45*, 4418-4426.
105. Vicente, E., Perez-Silanes, S., Lima, L. M., Ancizu, S., Burguete, A., Solano, B., Villar, R., Aldana, I., Monge, A. "Selective activity against *Mycobacterium tuberculosis* of new quinoxaline 1,4-di-*N*-oxides". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2009**, *17*, 385-389.
106. Marin, A., Lima, L. M., Solano, B., Vicente, E., Perez-Silanes, S., Maurel, S., Sauvain, M., Aldana, I., Monge, A., Deharo, E. "Antiplasmodial structure-activity relationship of 3-trifluoromethyl-2-arylcarbonylquinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives". *Experimental Parasitology*. **2008**, *118*, 25-31.
107. Vicente, E., Charnaud, S., Bongard, E., Villar, R., Burguete, A., Solano, B., Ancizu, S., Perez-Silanes, S., Aldana, I., Monge, A. "Synthesis and antiplasmodial activity of 3-furyl and 3-thienylquinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-*N*-oxide derivatives". *Molecules*. **2008**, *13*, 69-77.
108. Vicente, E., Lima, L. M., Bongard, E., Charnaud, S., Villar, R., Solano, B., Burguete, A., Perez-Silanes, S., Aldana, I., Vivas, L., Monge, A. "Synthesis and structure-activity relationship of 3-phenylquinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives as antimalarial agents". *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, *43*, 1903-1910.
109. Zarranz, B., Jaso, A., Lima, L. M., Aldana, I., Monge, A., Maurel, S., Sauvain, M. "Antiplasmodial activity of 3-trifluoromethyl-2-carbonylquinoxaline di-*N*-oxide derivatives". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2006**, *42*, 357-361.
110. Zarranz, B., Jaso, A., Aldana, I., Monge, A., Maurel, S., Deharo, E., Jullian, V., Sauvain, M. "Synthesis and antimalarial activity of new 3-



- arylquinoxaline-2-carbonitrile derivatives”. *Arzneimittel-Forschung-Drug Research*. **2005**, *55*, 754-761.
111. Aldana, I., Ortega, M. A., Jaso, A., Zarranz, B., Oporto, P., Gimenez, A., Monge, A., Deharo, E. “Anti-malarial activity of some 7-chloro-2-quinoxalinecarbonitrile-1,4-di-*N*-oxide derivatives”. *Pharmazie*. **2002**, *58*, 68-69.
112. Vicente, E., Duchowicz, P. R., Benitez, D., Castro, E. A., Cerecetto, H., Gonzalez, M., Monge, A. “Anti-*T. cruzi* activities and QSAR studies of 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile di-*N*-oxides”. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, *20*, 4831-4835.
113. Burguete, A., Estevez, Y., Castillo, D., Gonzalez, G., Villar, R., Solano, B., Vicente, E., Perez-Silanes, S., Aldana, I., Monge, A., Sauvain, M., Deharo, E. “Anti-leishmanial and structure-activity relationship of ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-*N*-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives”. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **2008**, *103*, 778-780.
114. Junnotula, V., Rajapakse, A., Arbillaga, L., Lopez de Cerain, A., Solano, B., Villar, R., Monge, A., Gates, K. S. “DNA strand cleaving properties and hipoxia-selective cytotoxicity of 7-chloro-2-thienylcarbonyl-3-trifluoromethylquinoxaline 1,4-dioxide”. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2010**, *18*, 3125-3132.
115. Solano, B., Junnotula, V., Marin, A., Villar, R., Burguete, A., Vicente, E., Perez-Silanes, S., Aldana, I., Monge, A., Dutta, S., Sarkar, U., Gates, K. S. “Synthesis and biological evaluation of new 2-arylcarbonyl-3-trifluoromethylquinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives and their reduced analogs”. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2007**, *50*, 5485-5492.
116. Zarranz, B., Jaso, A., Aldana, I., Monge, A. “Synthesis and anticancer activity evaluation of new 2-alkylcarbonyl and 2-benzoyl-3-trifluoromethylquinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives”. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2004**, *12*, 3711-3721.
117. Haworth, H. D., Robinson, S. “Synthetic antimalarials. Part XXVII. Some derivatives of phthalazine, quinoxaline and isoquinoline”. *Journal of the Chemical Society*. **1948**, *174*, 777-782.

118. Moreno, H. R., Schultz, H. P. "Quinoxalinestudies. XVII. Potential antimalarials. Some (RS)- $\alpha$ -(dialkylaminomethyl)-6-chloro-2-quinoxaline-methanols". *Journal of Medicinal Chemistry*. **1970**, *13*, 1005-1008.
119. Moreno, H. R., Schultz, H. P. "Quinoxaline studies. XV. Potential antimalarials. Some (RS)- $\alpha$ -(dialkylaminomethyl)-2-quinoxalinemethanols". *Journal of Medicinal Chemistry*. **1970**, *13*, 119-121.
120. Moreno, H. R., Schultz, H. P., Oatis, J. E. "Quinoxaline studies. XX. Potential antimalarials- Synthesis of anti-*N,N*-dialkylaminomethyl and syn-*N,N*-dialkylaminomethyl 2-quinoxalinyll ketoximes". *Journal of Medicinal Chemistry*. **1972**, *15*, 433-434.
121. Fisher, G. H., Moreno, H. R., Oatis, J. E., Schultz, H. P. "Quinoxaline studies. 23. Potential antimalarials-Substituted 5,8-dimethoxyquinoxalines". *Journal of Medicinal Chemistry*. **1975**, *18*, 746-752.
122. Djudovic, P., Maier, W., Piekarski, G., Schornstein, U., Zymalkowski, F. "Synthesis of quinoline-3-derivatives and quinoxaline-2-derivatives and their actions against various malarial parasites". *Pharmazie*. **1976**, *31*, 845-849.
123. Rangisetty, J. B., Gupta, C., Prasad, A. L., Srinivas, P., Sridhar, N., Parimoo, P., Veeranjanyulu, A. "Synthesis of new arilaminoquinoxalines and their antimalarial activity in mice". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2001**, *53*, 1409-1413.
124. Guillon, J., Greiller, P., Labaied, M., Sonnet, P., Leger, J. M., Deprez-Poulain, R., Forfar-Bares, I., Dallemagne, P., Lemaitre, N., Pehourq, F., Rochette, J., Sergheraert, C., Jarry, C. "Synthesis, antimalarial activity and molecular modeling of new pyrrolo[1,2-a]quinoxalines, bispyrrolo[1,2-a]quinoxalines, bispyrrolo[3,2-e]pyrrolo[1,2-a]pyrazines and bispyrrolo[1,2-a]thieno[3,2-e]pyrazines". *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, *47*, 1997-2009.
125. Loriga, M., Piras, S., Paglietti, G., Costi, M. P., Venturelli, A. "Quinoxaline chemistry. Part 15. 4-[2-quinoxalylmethylenimino]-benzoylglutamates and benzoates 4-[2-quinoxalylmethyl-*N*-methylamino]-benzoylglutamates as analogues of classical antifolate agents. Synthesis, elucidation of structures and in vitro evaluation of antifolate and anticancer activities". *Farmaco*. **2003**, *58*, 51-61.

126. Hui, X., Desrivot, J., Loiseau, P. M., Franck, X., Hocquemiller, R., Figadere, B. "Synthesis and antiprotozoal activity of some new synthetic substituted quinoxalines". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2006**, *16*, 815-820.
127. Guillon, J., Forfar, I., Mamani-Matsuda, M., Desplat, V., Saliege, M., Thiolat, D., Massip, S., Tabourier, A., Leger, J. M., Dufaure, B., Haumont, G., Jarry, C., Mossalayi, D. "Synthesis, analytical behavior and biological evaluation of new 4-substituted pyrrolo[1,2-a]quinoxalines as antileishmanial agents". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2007**, *15*, 194-210.
128. Estevez, Y., Quiliano, M., Burguete, A., Cabanillas, B., Zimic, M., Malaga, E., Verastegui, M., Perez-Silanes, S., Aldana, I., Monge, A., Castillo, D., Deharo, E. "Trypanocidal properties, structure-activity relationship and computational studies of quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives". *Experimental Parasitology*. **2011**, *127*, 745-751.
129. Peixoto, M. P., Beverly, S. M. "In vitro activity of sulfonamides and sulfones against *Leishmania major* promastigotes". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1987**, *31*, 1575-1578.
130. Dea-Ayuela, M. A., Castillo, E., Gonzalez-Alvarez, M., Vega, C., Rolón, M., Bolas-Fernandez, F., Borrás, J., Gonzalez-Rosende, M. E. "In vivo and in vitro anti-leishmanial activities of 4-nitro-*N*-pyrimidin- and *N*-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and *N*<sup>2</sup>-(4-nitrophenyl)-*N*<sup>1</sup>-propylglycinamide". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2009**, *17*, 7449-7456.
131. Bilbao-Ramos, P., Galiana-Rosello, C., Dea-Ayuela, M. A., Gonzalez-Alvarez, M., Vega, C., Rolon, M., Perez-Serrano, J., Bolas-Fernandez, F., Gonzalez-Rosende, M. E. "Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities". *Parasitology International*. **2012**, *61*, 604-613.
132. Krungkrai, S. R., Krungkrai, J. "Malaria parasite carbonic anhydrase: inhibition of aromatic/heterocyclic sulfonamides and its therapeutic potential". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **2011**, *1*, 233-242.
133. Krungkrai, J., Krungkrai, S. R., Supuran, C. T. "Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase with aromatic/heterocyclic sulfonamides-*in vitro* and *in vivo* studies". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, *18*, 5466-5471.

134. Loiseau, P. M., Le Bras, J. “New drugs against parasitic diseases”. *La Revue du praticien*. **2007**, *57*, 175-182.
135. Dupouy-Camet, J. “New drugs for the treatment of human parasitic protozoa”. *Parassitologia*. **2004**, *46*, 81-84.
136. Cunico, W., Gomes, C. R., Facchinetti, V., Moreth, M., Penido, C., Henriques, M. G., Varotti, F. P., Krettli, L. G., Krettli, A. U., da Silva, F. S., Caffarena, E. R., de Magalhaes, C. S. “Synthesis, antimalarial evaluation and molecular modeling studies of hydroxyethylpiperazines, potential aspartyl protease inhibitors, part 2”. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2009**, *44*, 3816-3820.
137. Mendoza, A., Perez-Silanes, S., Quiliano, M., Pabon, A., Galiano, S., Gonzalez, G., Garavito, G., Zimic, M., Vaisberg, A., Aldana, I., Monge, A., Deharo, E. “Aryl piperazine and pyrrolidine as antimalarial agents. Synthesis and investigation of structure-activity relationships”. *Experimental Parasitology*. **2011**, *128*, 97-103.
138. Mayence, A., Vanden Eynde, J. J., LeCour, L. Jr., Walker, L. A., Tekwani, B. L., Huang, T. L. “Piperazine-linked bisbenzamidines: a novel class of antileishmanial agents”. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, *39*, 547-553.
139. Ardestani, S. K., Poorrajab, F., Razmi, S., Foroumadi, A., Ajdary, S., Gharegozlou, B., Behrouzi-Fardmoghadam, M., Shafiee, A. “Cell death features induced in *Leishmania major* by 1,3,4-thiadiazole derivatives”. *Experimental Parasitology*. **2012**, *132*, 116-122.
140. Pourrajab, F., Forouzannia, S. K., Tabatabaee, S. A. “Novel immunomodulatory function of 1,3,4-thiadiazole derivatives with leishmanicidal activity”. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. **2012**, *67*, 1968-1978.
141. Poorrajab, F., Ardestani, S. K., Foroumadi, A., Emami, S., Kariminia, A., Behrouzi-Fardmoghadam, M., Shafiee, A. “Selective leishmanicidal effect of 1,3,4-thiadiazole derivatives and possible mechanism of action against *Leishmania* species”. *Experimental Parasitology*. **2009**, *121*, 323-330.
142. Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; da Silva Bolzani, V.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. “Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes”. *Current Medicinal Chemistry*. **2007**, *14*, 1829-1852.

143. Casagrande, M., Barteselli, A., Basilico, N., Parapini, S., Taramelli, D., Sparatore, A. "Synthesis and antiplasmodial activity of new heteroaryl derivatives of 7-chloro-4-aminoquinoline". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2012**, *20*, 5965-5979.
144. Ekoue-Kovi, K., Yearick, K., Iwaniuk, D. P., Natarajan, J. K., Alumasa, J., de Dios, A. C., Roepe, P. D., Wolf, C. "Synthesis and antimalarial activity of new 4-amino-7-chloroquinolyl amides, sulfonamides, ureas and thioureas". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2009**, *17*, 270-283.
145. Kumar, A., Srivastava, K., Kumar, S. R., Puri, S. K., Chauhan, P. M. S. "Synthesis and bioevaluation of hybrid 4-aminoquinoline triazines as a new class of antimalarial agents". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, *18*, 6530-6533.
146. Khan, M. O. F., Levi, M. S., Tekwani, B. L., Wilson, N. H., Borne, R. F. "Synthesis of isoquinuclidine analogs of chloroquine: Antimalarial and antileishmanial activity". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2007**, *15*, 3919-3925.
147. Melato, S., Coghi, P., Basilico, N., Prospero, D., Monti, D. "Novel 4-aminoquinolines through microwave-assisted S<sub>N</sub>Ar reactions: a practical route to antimalarial agents". *European Journal of Organic Chemistry*. **2007**, *36*, 6118-6123.
148. Dyall, L. K. "Oxydative cyclizations. VII. Cyclization of 2-substituted anilines with alkaline hypohalite". *Australian Journal of Chemistry*. **1984**, *35*, 2013-2026.
149. Gasco, A., Boulton, J. "Furoxans and benzofuroxans". *Advances in Heterocyclic Chemistry*. **1981**, *29*, 251-340.
150. Leyva, S., Castanedo, V., Leyva, E. "Synthesis of novel fluorobenzofuroxans by oxidation of anilines and thermal cyclization of arylazides". *Journal of Fluorine Chemistry*. **2003**, *121*, 171-175.
151. Kotovskaya, S. K., Romanova, S. A., Charushin, V. N., Kodess, M. I., Chupakhin, O. N. "5(6)-Fluoro-6(5)-R-benzofuroxans: synthesis and NMR <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>19</sup>F studies". *Journal of Fluorine Chemistry*. **2004**, *125*, 421-428.
152. Carey, F. A., Sundberg, R. J., "Aromatic Substitution Reactions". *Advanced Organic Chemistry. Part B: Reactions and Synthesis*. 5<sup>th</sup> ed.; Springer **2007**.

153. Chaykovsky, M., Adolph, H. G. "Substituent effects in the conversion of azido- and diazidonitrobenzenes to benzofuroxans and difuroxans". *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **1991**, 28, 1491-1495.
154. Cmoch, P., Wiench, J. W., Stefaniak, L., Webb, G. A. "An NMR study and ab initio molecular orbital calculation of substituted benzofuroxans and the salt of 4,6-dinitrobenzofuroxan". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **1999**, 55, 2207-2214.
155. Zarranz, B. "Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de 1,4 di-*N*-óxido de quinoxalina como agentes antituberculosos". Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra; **2004**.
156. Haddadin, M., Agopian, G., Issidorides, C. "Synthesis and photolysis of some substituted quinoxaline di-*N*-oxides". *Journal of Organic Chemistry*. **1971**, 36, 514-518.
157. Haddadin, M., Issidorides, C. "The Beirut Reaction". *Heterocycles*. **1993**, 35, 1503-1523.
158. Haddadin, M., Issidorides, C. "Enamines with isobenzofuroxan: a novel synthesis of quinoxaline di-*N*-oxides". *Tetrahedron Letters*. **1965**, 36, 3253-3256.
159. Haddadin, M. J., Taha, M. U., Jarrar, A. A., Issidorides, C. H. "Reaction of benzofurazan oxide with unsymmetrical 1,3-diketones; Steric and polar effects". *Tetrahedron*. **1976**, 32, 719-724.
160. Stumm, G., Niclas, H. J. "An improved and efficient synthesis of quinoxalinecarboxamide 1,4-dioxides from benzofuroxan and acetoacetamides in the presence of calcium salts". *Journal fur Praktische Chemie*. **1989**, 331, 736-741.
161. Issidorides, C., Haddadin, M. "Benzofurazan oxide. II. Reactions with enolate anions". *Journal of Organic Chemistry*. **1966**, 31, 4067-4068.
162. Ancizu, S., Moreno, E., Torres, E., Burguete, A., Perez-Silanes, S., Benitez, D., Villar, R., Solano, B., Marin, A., Aldana, I., Cerecetto, H., Gonzalez, M., Monge, A. "Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-*N*-oxidequinoxalin-2-yl)amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs". *Molecules*. **2009**, 14, 2256-2272.
163. Waitkins, G. R., Clark, C. W. "Selenium dioxide: preparation, properties and use as oxidizing agent". *Chemical Reviews*. **1945**, 36, 235-289.

164. Burguete, A. "Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de quinoxalina y 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina con aplicación en diferentes áreas terapéuticas". Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra; **2010**.
165. Smith, M. B., March, J. *March's advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms and structure*. 5<sup>th</sup> ed.; John Wiley and Sons, Inc. New York (USA). **2001**, p. 574.
166. Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P. *Organic chemistry*. 1<sup>st</sup> ed.; Oxford University Press Inc. New York (USA). **2001**, p. 1166.
167. Chauviere, G., Bernard, B., Enanga, B., de Albuquerque, C., Croft, S. L., Dumas, M., Perie, J. "Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogous to megazol, a trypanocidal lead". *Journal of Medicinal Chemistry*. **2003**, *46*, 427-440.
168. Iqbal, R., Rama, N. H., Yunus, U., Saeed, A., Zamani, K. "Synthesis of some new 2-(4-halophenylamino)-5-(isomeric pyridyl)-1,3,4-thiadiazoles". *Journal of the Chemical Society of Pakistan*. **1997**, *19*, 77-82.
169. Wade, L. G. Jr. *Química orgánica*. 5<sup>a</sup> ed.; Pearson Prentice Hall, Madrid. 2004, p. 854.
170. Trager, W., Jensen, J. B. "Human Malaria Parasites in Continuous Culture". *Science*. **1976**, *193*, 673-675.
171. Desjardins, R. E., Canfield, C. J., Haynes, J. D., Chulay, J. D. "Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by semiautomated microdilution technique". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1979**, *16*, 710-718.
172. Huber, W., Koella, J. C. "A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites". *Acta Tropica*. **1993**, *55*, 257-261.
173. Teixeira, M.C., de Jesús Santos, R., Sampaio, R. B., Pontes-de-Carvalho, L., dos-Santos, W. L. "A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species". *Parasitology Research*. **2002**, *88*, 963-968.
174. Sauvain, M., Dedet, J. P., Kunesch, N., Poisson, J., Gayral, P., Gantier, J. C., Kunesch, G. "*In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activities of natural and synthetic quinoids". *Phytotherapy Research*. **1993**, *7*, 167-171.

175. Sereno, D., Lemesre, J. L. "Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis in vitro*". *Parasitology Research*. **1997**, 83, 401-403.
176. Castillo, D., Arevalo, J., Herrera, F., Ruiz, C., Rojas, R., Rengifo, E., Vaisberg, A., Lock, O., Lemesre, J. L., Gornitzka, H., Sauvain, M. "Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae)". *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 112, 410-414.
177. Ertl, P., Rohde, B., Selzer, P. "Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties". *Journal Medicinal Chemistry*. **2000**, 43, 3714-3717.
178. Zhao, Y. H., Abraham, M. H., Le, J., Hersey, A., Luscombe, C. N., Beck, G., Sherbone, B., Cooper, I. "Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies". *Pharmaceutical Research*. **2002**, 19, 1446-1457.
179. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings" *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2001**, 46, 3-26.
180. Disponible en: <http://www.cresset-group.com/>
181. Cheeseright, T., Mackey, M., Rose, S., Vinter, J. G. "Molecular field extrema as descriptors of biological activity: definition and validation". *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2006**, 46, 665-676.
182. Gordon, L. F. "Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1980**, 69, 1109.
183. Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D. "Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates". *Journal of Medicinal Chemistry*. **2002**, 45, 2615-2623.

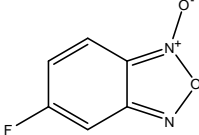
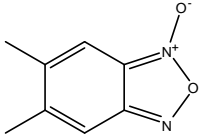
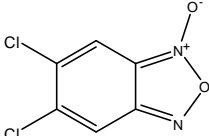
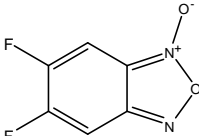


# **ANEXOS**

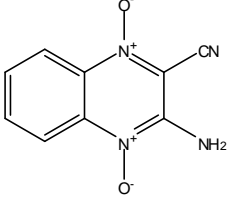


## RELACIÓN DE COMPUESTOS SINTETIZADOS

### Benzofuroxanos

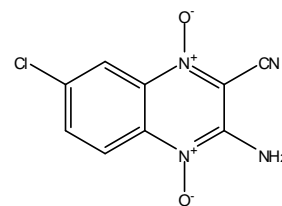
Nombre	Estructura
5-fluorobenzofuroxano	
5,6-dimetilbenzofuroxano	
5,6- diclorobenzofuroxano	
5,6-difluorobenzofuroxano	

### Quinoxalinas 1,4 di-N-óxido

Nombre	Estructura
3-amino-2-cianoquinoxalina 1,4-di-N-óxido	

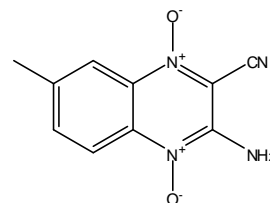
---

3-amino-2-ciano-7-cloroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



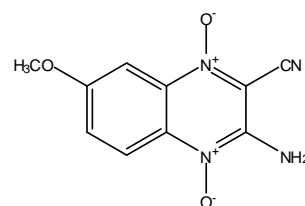
---

3-amino-2-ciano-7-metilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



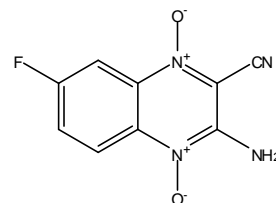
---

3-amino-2-ciano-7-metoxiquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



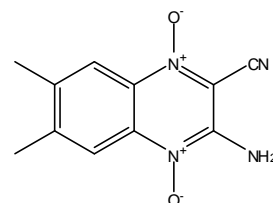
---

3-amino-2-ciano-7-fluoroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



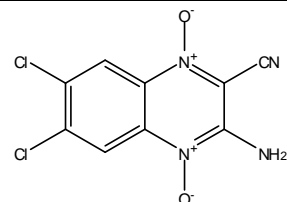
---

3-amino-2-ciano-6,7-dimetilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



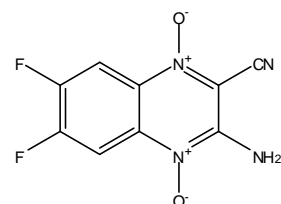
---

3-amino-2-ciano-6,7-dicloroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



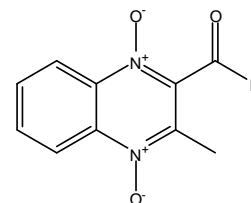
---

3-amino-2-ciano-6,7-difluoroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



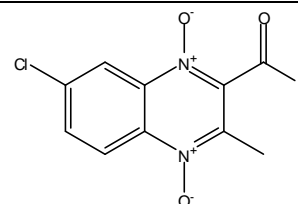
---

2-formil-3-metilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



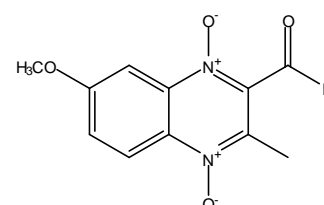
---

7-cloro-2-formil-3-metilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



---

2-formil-3-metil-7-metoxiquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



## Compuestos finales

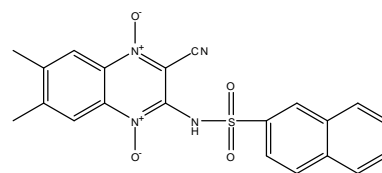
Compuesto	Nombre	Estructura
<b>1.1b</b>	2-ciano-7-cloro-3-(naftaleno-2-sulfonamida)quinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido	
<b>1.1c</b>	2-ciano-7-metil-3-(naftaleno-2-sulfonamida)quinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido	

---

---

**1.1f**

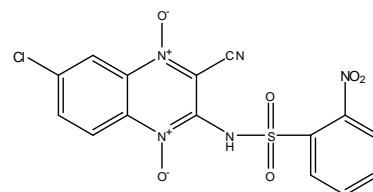
2-ciano-6,7-dimetil-3-(naftaleno-2-sulfonamida)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



---

**1.2b**

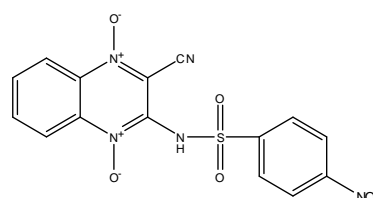
2-ciano-7-cloro-3-(2-nitrofenilsulfonamido)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



---

**1.3a**

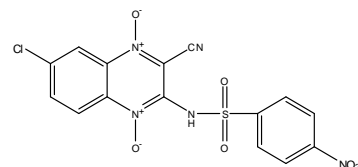
2-ciano-3-(4-nitrofenilsulfonamido)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



---

**1.3b**

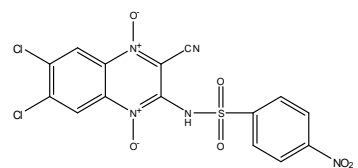
2-ciano-7-cloro-3-(4-nitrofenilsulfonamido)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



---

**1.3g**

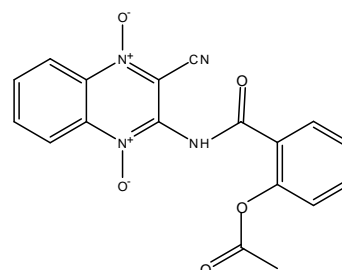
2-ciano-6,7-dicloro-3-(4-nitrofenilsulfonamido)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



---

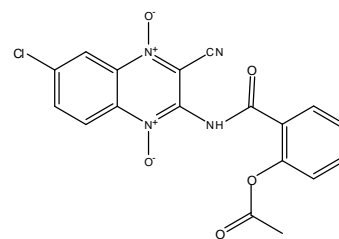
**2a**

3-(2-acetoxibenzamido)-2-cianoquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



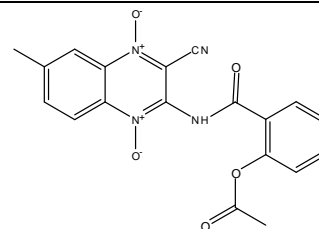
**2b**

3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-7-  
cloroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



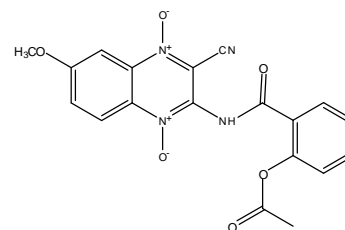
**2c**

3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-7-  
metilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



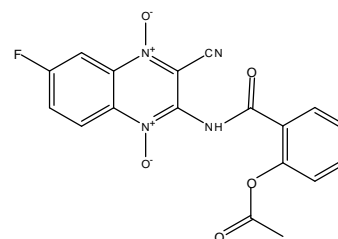
**2d**

3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-7-  
metoxiquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



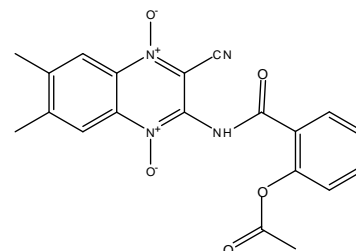
**2e**

3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-7-  
fluoroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



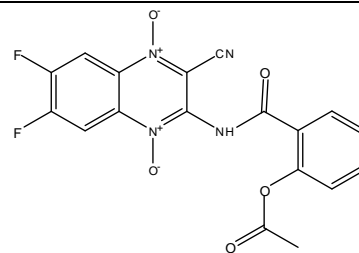
**2f**

3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-6,7-  
dimetilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



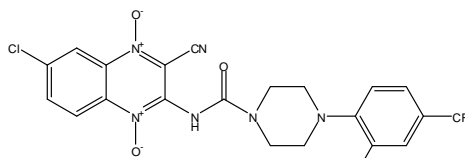
**2h**

3-(2-acetoxibenzamido)-2-ciano-6,7-difluoroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



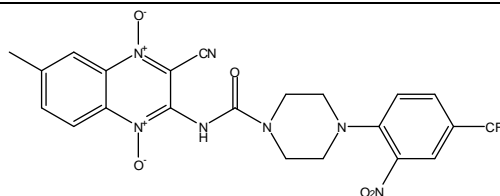
**3.1b**

2-ciano-7-cloro-3-(4-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



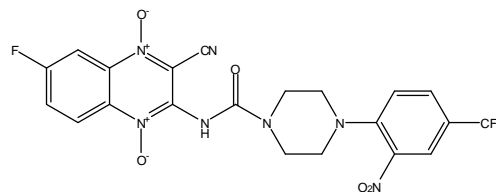
**3.1c**

2-ciano-7-metil-3-(4-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



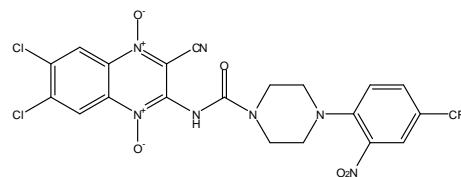
**3.1e**

2-ciano-7-fluoro-3-(4-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



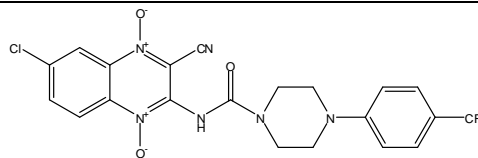
**3.1g**

2-ciano-6,7-dicloro-3-(4-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido

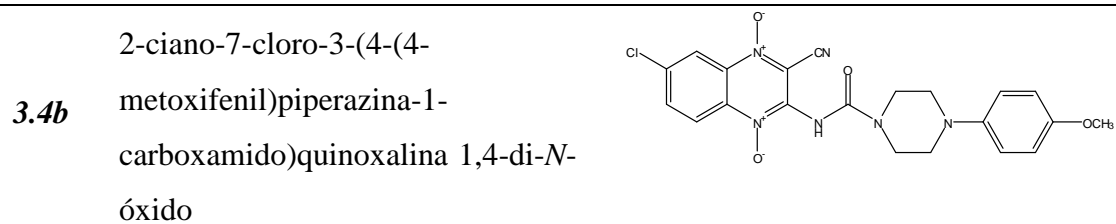
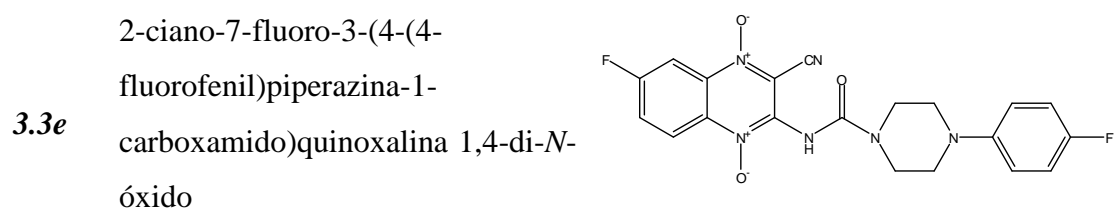
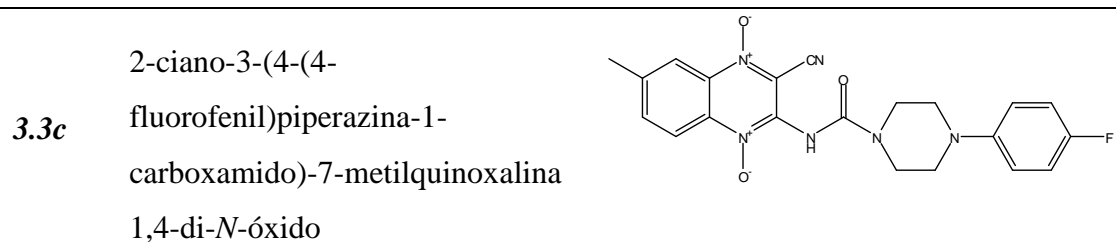
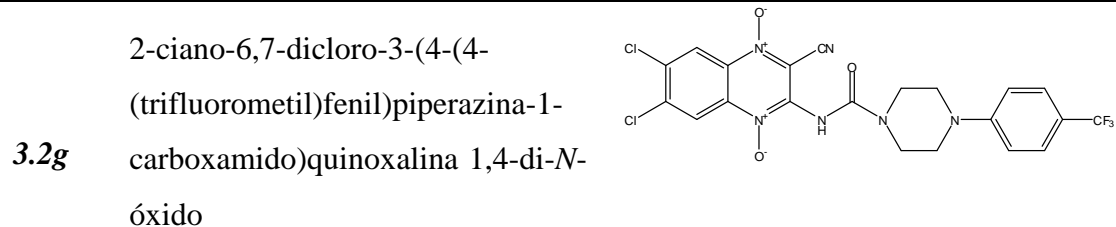
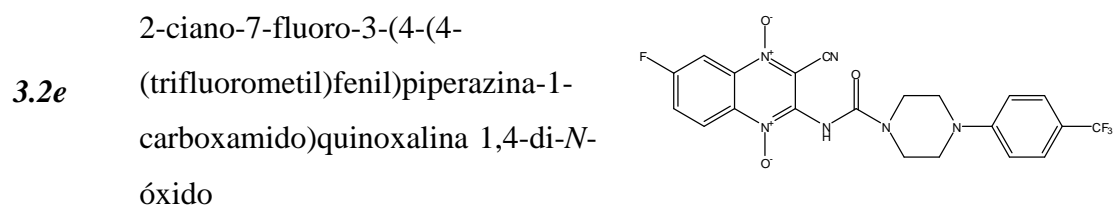
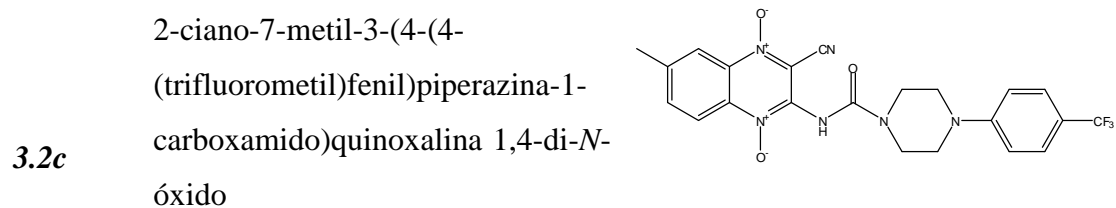


**3.2b**

2-ciano-7-cloro-3-(4-(4-(trifluorometil)fenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido





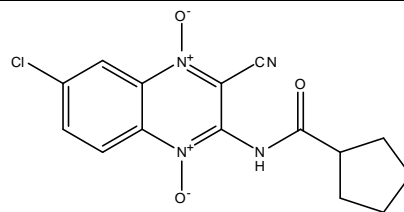


<b>3.4c</b>	2-ciano-7-metil-3-(4-(4-metoxifenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido	
<b>3.4g</b>	2-ciano-6,7-dicloro-3-(4-(4-metoxifenil)piperazina-1-carboxamido)quinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido	
<b>4.1a</b>	2-ciano-3-(ciclopropanocarboxamido)quinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido	
<b>4.1b</b>	2-ciano-3-(ciclopropanocarboxamido)-7-cloroquinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido	
<b>4.1c</b>	2-ciano-3-(ciclopropanocarboxamido)-7-metilquinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido	
<b>4.1d</b>	2-ciano-3-(ciclopropanocarboxamido)-7-metoxiquinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido	

---

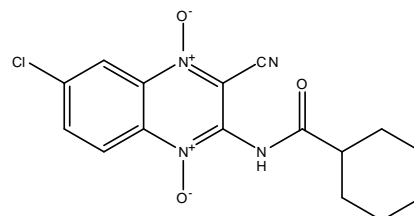
**4.2b**

2-ciano-3-(ciclopentanocarboxamido)-7-cloroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



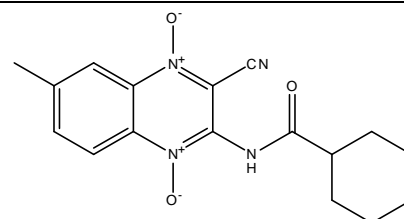
**4.3b**

2-ciano-3-(ciclohexancarboxamido)-7-cloroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



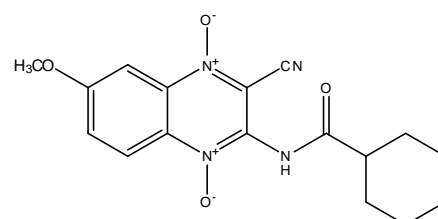
**4.3c**

2-ciano-3-(ciclohexancarboxamido)-7-metilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



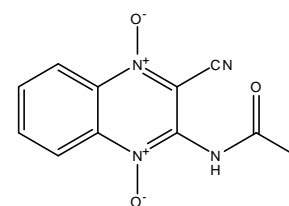
**4.3d**

2-ciano-3-(ciclohexancarboxamido)-7-metoxiquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



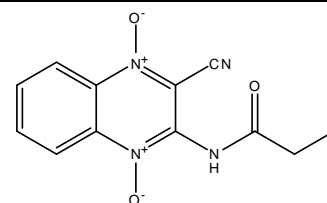
**5.1a**

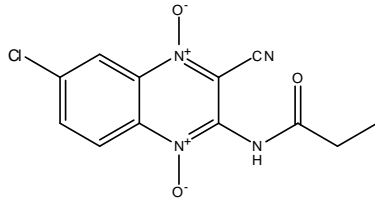
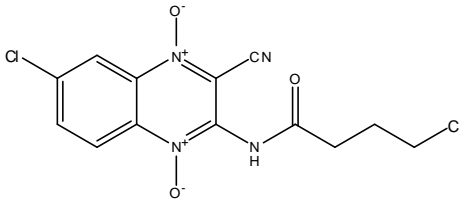
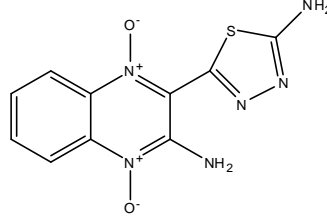
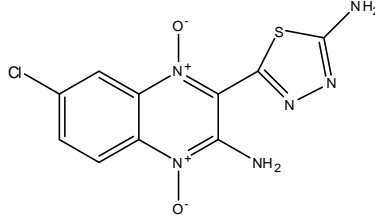
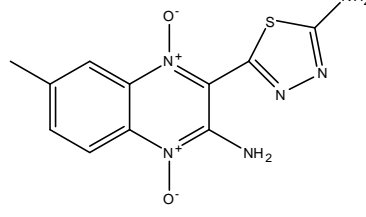
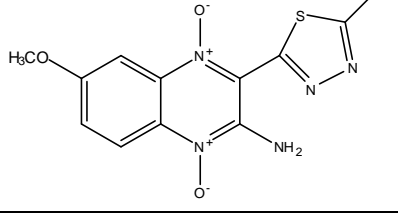
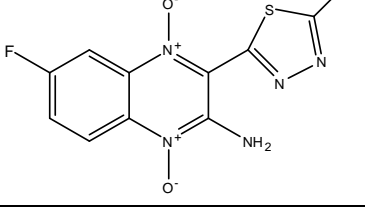
3-acetamido-2-cianoquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



**5.2a**

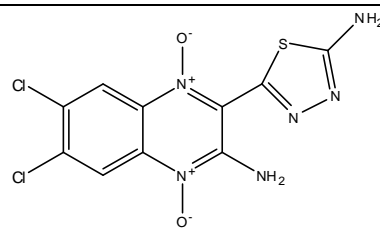
2-ciano-3-propionamidoquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



<p><b>5.2b</b></p>	<p>2-ciano-7-cloro-3-propionamidoquinoxalina 1,4-di-<i>N</i>-óxido</p>	
<p><b>5.3b</b></p>	<p>2-ciano-7-cloro-3-(4-clorobutanamido)quinoxalina 1,4-di-<i>N</i>-óxido</p>	
<p><b>6a</b></p>	<p>3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol-2-il)quinoxalina 1,4-di-<i>N</i>-óxido</p>	
<p><b>6b</b></p>	<p>3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol-2-il)-7-cloroquinoxalina 1,4-di-<i>N</i>-óxido</p>	
<p><b>6c</b></p>	<p>3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol-2-il)-7-metilquinoxalina 1,4-di-<i>N</i>-óxido</p>	
<p><b>6d</b></p>	<p>3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol-2-il)-7-metoxiquinoxalina 1,4-di-<i>N</i>-óxido</p>	
<p><b>6e</b></p>	<p>3-amino-2-(5-amino-1,3,4-tiodiazol-2-il)-7-fluoroquinoxalina 1,4-di-<i>N</i>-óxido</p>	

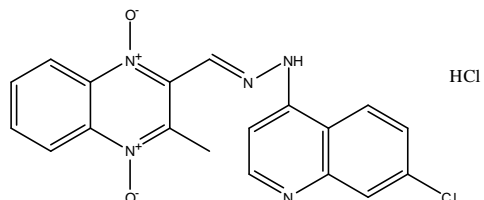
**6g**

3-amino-2-(5-amino-1,3,4-  
tiodiazol-2-il)-6,7-  
dicloroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



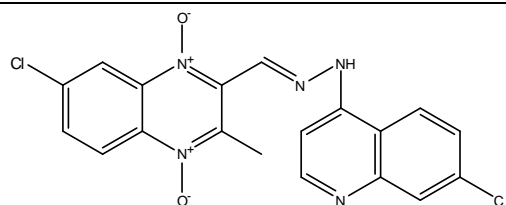
**7a**

Clorhidrato de (E)-2-((2-(7-  
cloroquinolin-4-il)hidrazono)metil)-  
3-metilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



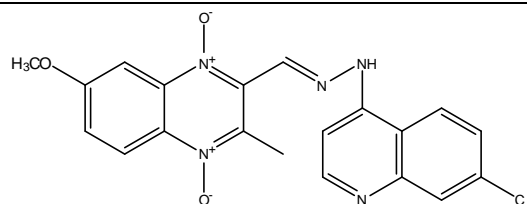
**7b**

(E)-7-cloro-2-((2-(7-cloroquinolin-  
4-il)hidrazono)metil)-3-  
metilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido



**7d**

(E)-2-((2-(7-cloroquinolin-4-  
il)hidrazono)metil)-3-metil-7-  
metoxiquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido





Barea C, Pabon A, Castillo D, Zimic M, Quiliano M, Galiano S, et al. [New salicylamide and sulfonamide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide with antileishmanial and antimalarial activities](#). Bioorg Med Chem Lett 2011 Aug 1;21(15):4498-4502.





Article

## Antiplasmodial and Leishmanicidal Activities of 2-Cyano-3-(4-phenylpiperazine-1-carboxamido) Quinoxaline 1,4-Dioxide Derivatives

Carlos Barea <sup>1,\*</sup>, Adriana Pabón <sup>2</sup>, Silvia Galiano <sup>1</sup>, Silvia Pérez-Silanes <sup>1</sup>, German Gonzalez <sup>3,4</sup>, Chloe Deyssard <sup>3,4</sup>, Antonio Monge <sup>1</sup>, Eric Deharo <sup>3,4</sup> and Ignacio Aldana <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research and Development of Novel Drugs Unit, Center for Applied Pharmacobiology Research (CIFA), University of Navarre, Pamplona 31080, Spain; E-Mails: sgaliano@unav.es (S.G.); sperez@unav.es (S.P.-S.); amonge@unav.es (A.M.); ialdana@unav.es (I.A.)

<sup>2</sup> Malaria Group, University of Antioquia, Medellín, Colombia; E-Mail: apabon72@gmail.com

<sup>3</sup> UMR 152 PharmaDev (Pharmacologie et Pharmacochimie pour le Développement), Université de Toulouse, UPS, 118, rte de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France; E-Mails: germangonzalez.a@hotmail.com (G.G.); c.deyssard@gmail.com (C.D.); ericdeharo@gmail.com (E.D.)

<sup>4</sup> UMR 152 PharmaDev Institut de Recherche pour le Développement, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université de Toulouse 3, 31062 Toulouse, France

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: cabareari@hotmail.com; Tel.: +34-948-425-653; Fax: +34-948-425-652.

Received: 28 June 2012; in revised form: 20 July 2012 / Accepted: 31 July 2012 /

Published: 7 August 2012

---

**Abstract:** Malaria and leishmaniasis are two of the World's most important tropical parasitic diseases. Thirteen new 2-cyano-3-(4-phenylpiperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide derivatives (CPCQs) were synthesized and evaluated for their *in vitro* antimalarial and antileishmanial activity against erythrocytic forms of *Plasmodium falciparum* and axenic forms of *Leishmania infantum*. Their toxicity against VERO cells (normal monkey kidney cells) was also assessed. None of the tested compounds was efficient against *Plasmodium*, but two of them showed good activity against *Leishmania*. Toxicity on VERO was correlated with leishmanicidal properties.

**Keywords:** quinoxaline; piperazine; *Plasmodium*; *Leishmania*; VERO

---

## 1. Introduction

Malaria is a major public health problem in more than 90 countries, affecting 40% of the World's poorest population. Mortality due to malaria is estimated to be over 1 million deaths annually and this situation is worsened by the spread of drug-resistant strains of the parasite. Therefore, new effective and affordable antimalarial agents are urgently needed [1,2].

Leishmaniasis threatens approximately 350 million people and almost 12 million people are currently infected with the disease. The emergence of resistant parasites, the high cost and toxicity of current treatments call for the discovery of new drugs [3,4].

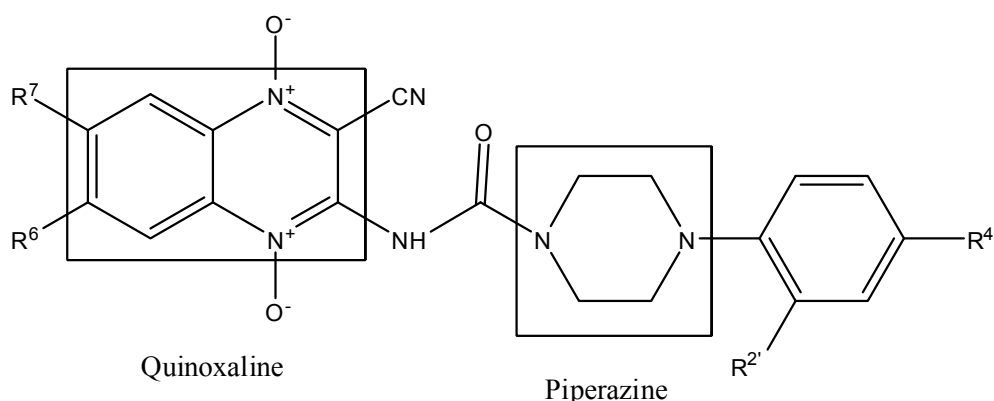
Quinoxalines, also known as 1,4-benzodiazines, are aromatic bicycles that present two nitrogen atoms on positions 1 and 4, described as bioisosteres of quinoline, naphthyl and some other heteroaromatic rings including pirazine [5].

Quinoxaline derivatives are of great interest as antimycobacterial, anti-inflammatory, anticancer and antiparasitic agents. More specifically, their 1,4-di-*N*-oxides are considered to be particularly important because they are responsible for a resulting increase in various biological properties [6].

As a result of different research projects, our group synthesized different series of quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives, with a great variety of substituents in positions 2, 3, 6 and 7 [7–15]. With the aim of improving their pharmacological properties, we synthesized compounds with a carbonitrile group in position 2, thereby enhancing their antiparasitic activity. We also added an amine group in position 3 in order to link together new molecules, leading to interesting activities [10,16].

*In silico* studies showed that piperazine derivatives could target *Plasmodium* plasmepsin II enzyme. We synthesized phenylpiperazines derivatives that were active against *Plasmodium falciparum* [17]. In this context, we have now synthesized thirteen new 3-amino-1,4-di-*N*-oxide quinoxaline-2-carbonitrile derivatives linked with phenyl piperazines analogs (Figure 1) and investigated their *in vitro* activity and toxicity against *Plasmodium falciparum* Colombian FCR-3 strain and *Leishmania infantum* [18].

**Figure 1.** Design of new CPCQs as potential drugs against *P. falciparum* and *L. infantum*.



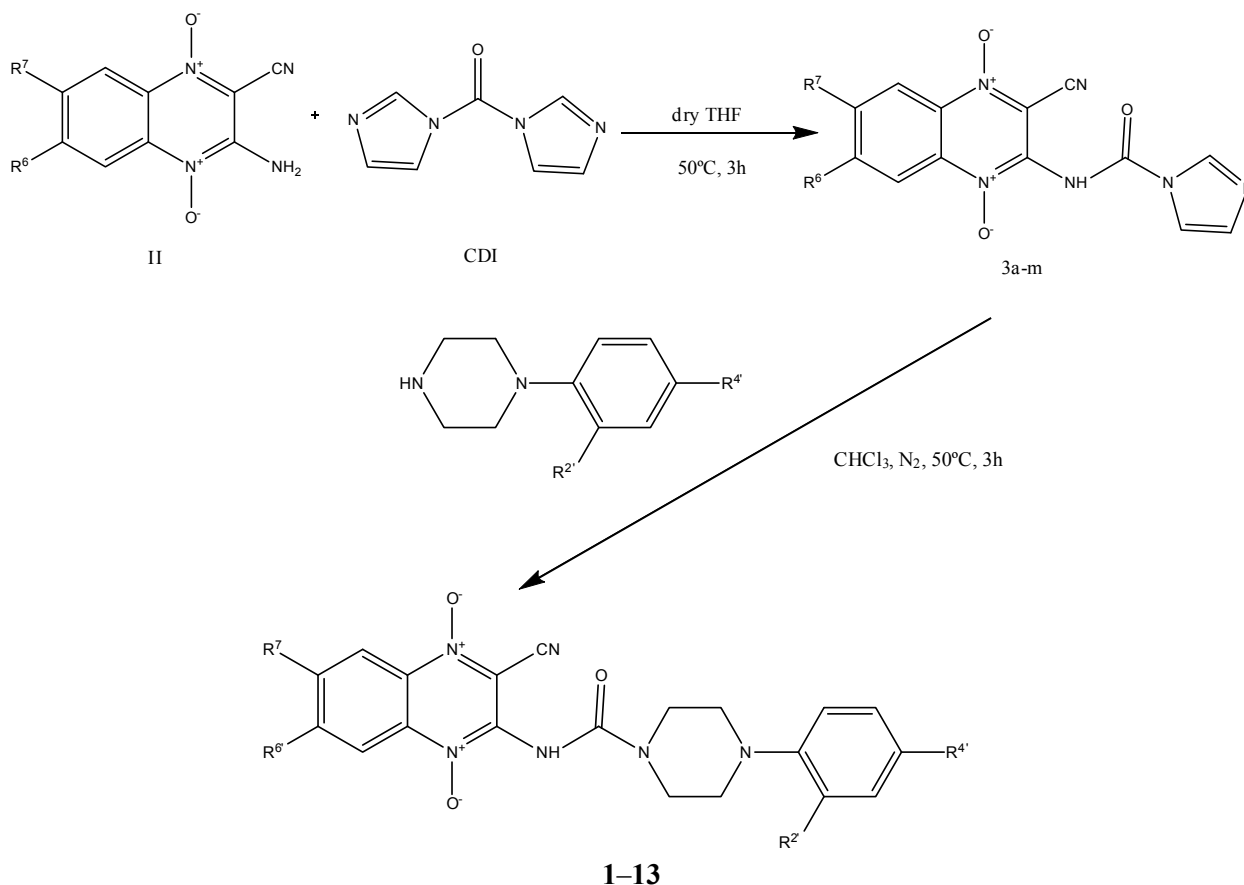
## 2. Results and Discussion

### 2.1. Chemistry

We prepared thirteen new 2-cyano-3-(4-phenylpiperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide derivatives (CPCQs; Scheme 1). The benzofuroxane starting compounds, (BFX, I), were prepared

using previously described methods [19,20]. The 3-amine-1,4-di-*N*-oxide quinoxaline-2-carbonitrile derivatives (cyanoamines, **II**) were obtained from the corresponding BFX by the Beirut reaction with malononitrile, using *N,N*-dimethylformamide (DMF) as solvent and triethylamine as catalyst [21].

**Scheme 1.** Synthetic route to CPCQs **1–13**.

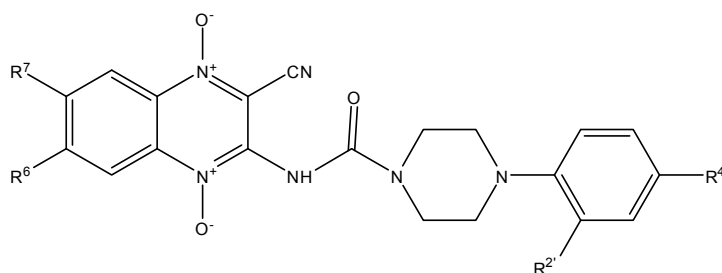


The method for synthesizing the final compounds consisted of two steps; the first one was the reaction of cyanoamines with an excess of commercially available 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) in order to obtain the intermediates **3a–m** that can react in the second step with the phenylpiperazines, thus affording the CPCQs [22].

## 2.2. Pharmacology and Structure-Activity Relationship

With regard to antiplasmodial activity shown in Table 1, halogen groups in  $R^7$  and/or  $R^6$  increase the activity as shown in previous series of quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives [16]. Compounds with  $\text{CF}_3$  or  $\text{CH}_3\text{O}$  groups at  $R^4$  show comparable activity, but higher activity than those which have F in that position. In relation with position  $R^2$ , the  $\text{NO}_2$  group does not increase the activity.

With regard to leishmanicidal activity shown in Table 1, among the most active compounds, **5** and **8** were also among the most cytotoxic compounds against VERO cells. Interestingly, the presence of halogen groups in  $R^7$  and/or  $R^6$ , responsible for increasing anti-malarial activity, also increased leishmanicidal activity. Moreover, the compounds without  $\text{NO}_2$  group in  $R^2$  showed considerably higher activity. Compounds with  $\text{CF}_3$  or F in  $R^4$  show similar activity, but higher activity than those with  $\text{CH}_3\text{O}$  in this position.

**Table 1.** Biological characterization of the thirteen new quinoxaline 1,4-di-*N*-oxides.

Compd.	MW	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>2'</sup>	R <sup>4'</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup>	SI <sup>d</sup>
1	537.5	H	Cl	NO <sub>2</sub>	CF <sub>3</sub>	24.5	21.8	7.0	0.3
2	517	H	CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	CF <sub>3</sub>	44.7	36.3	17.7	0.5
3	521	H	F	NO <sub>2</sub>	CF <sub>3</sub>	14.6	41.1	11.0	0.3
4	572	Cl	Cl	NO <sub>2</sub>	CF <sub>3</sub>	13.9	22.7	1.6	0.1
5	492.5	H	Cl	H	CF <sub>3</sub>	18.6	7.6	6.4	0.8
6	472	H	CH <sub>3</sub>	H	CF <sub>3</sub>	30.5	23.3	12.1	0.5
7	476	H	F	H	CF <sub>3</sub>	30.9	28.8	12.2	0.4
8	527	Cl	Cl	H	CF <sub>3</sub>	18.5	5.7	2.2	0.4
9	422	H	CH <sub>3</sub>	H	F	36.3	23.0	24.1	1.1
10	426	H	F	H	F	34.3	31.3	24.3	0.8
11	454.5	H	Cl	H	CH <sub>3</sub> O	12.8	18.8	47.5	2.5
12	434	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub> O	30.4	30.0	183.5	6.1
13	489	Cl	Cl	H	CH <sub>3</sub> O	26.1	10.9	14.0	1.3
CQ	320					0.1			
DOX	543.5						6.4	0.4	>10

Selectivity index (SI): DT<sub>50</sub> drug/IC<sub>50</sub> drug. MW: molecular weight; <sup>a</sup> IC<sub>50</sub> against *P. falciparum* FCR-3; <sup>b</sup> IC<sub>50</sub> against *L. Infantum*; <sup>c</sup> Cytotoxicity in VERO cells; <sup>d</sup> Selectivity index.

### 3. Experimental

#### 3.1. Chemical Synthesis

##### 3.1.1. General Remarks

All of the synthesized compounds were chemically characterized by thin layer chromatography (TLC), infrared (IR), proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR), melting point and elemental microanalyses (CHN). Alugram SIL G/UV254 (0.2 mm layer, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., Düren, Germany) was used for TLC and silica gel 60 (0.040–0.063 mm, Merck, Darmstadt, Germany) was used for Flash Column Chromatography. The <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on a Bruker 400 Ultrashield instrument (400 MHz, Bruker, Billerica, MA, USA), using TMS as internal standard and with DMSO-*d*<sub>6</sub> as solvent; the chemical shifts are reported in ppm (δ) and coupling constants (*J*) values are given in Hertz (Hz). Signal multiplicities are represented by: s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (double doublet) and m (multiplet). The IR spectra were recorded on a Nicolet Nexus FTIR (Thermo, Madison, WI, USA) in KBr pellets. Elemental microanalyses were obtained on a CHN-900 Elemental Analyzer (Leco, Tres Cantos, Spain) from vacuum-dried samples. The analytical results for C, H and N, were within ± 0.5 of the theoretical

values. Chemicals were purchased from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain), Sigma-Aldrich Química, S.A. (Alcobendas, Spain), Acros Organics (Janssen Pharmaceutical, Geel, Belgium) and Lancaster (Bischheim-Strasbourg, France).

### 3.1.2. General Procedure for the Synthesis of Cyanoamines II

Malononitrile (18.0 mmol) was added to a solution of the appropriate benzofuroxane (**I**, 15.0 mmol) in DMF (10 mL). The mixture was allowed to stand at 0 °C. Triethylamine (1.5 mL) was added dropwise, and the reaction mixture was stirred at room temperature in darkness for 1 day. The resulting precipitate was filtered off and washed by adding diethyl ether, affording the target compound. The obtained red solid was used in the next step without further purification [10]. The yield of this reaction depends on the substituents in position 5 and 6 in the benzofuroxane.

### 3.1.3. General Procedure for the Synthesis of 2-Cyano-3-(4-phenylpiperazine-1-carboxamido) Quinoxaline 1,4-Dioxide (CPCQs)

The corresponding cyanoamine (5.0 mmol) was reacted with a slight excess (1.5 equiv.) of 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) in dry tetrahydrofuran (40 mL) during 3 hours at 50 °C. The solvent was removed *in vacuo*. The solid was then purified by column chromatography with toluene/dioxane (6:4) as the solvent; this solvent was subsequently removed *in vacuo*. The intermediate (2.5 mmol) was stirred with an excess of phenylpiperazine (1.2 equiv.) in chloroform during 3 h at 50 °C and under nitrogen atmosphere. Next, the solvent was removed *in vacuo* and the solid was collected and purified by column chromatography using dichloromethane/methanol (9:1). Finally, the solvent was removed *in vacuo* and the solid precipitated with cold diethyl ether, and filtered off to obtain a solid [22].

*7-Chloro-2-cyano-3-(4-(2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide (1)*. Yield 30%; <sup>1</sup>H-NMR δ ppm: 8.30 (s, 1H, H<sub>11'</sub>); 8.24 (d, 2H, H<sub>2</sub>, J<sub>2'-3'</sub> = 2.44 Hz); 8.22 (dd, 1H, H<sub>9</sub>, J<sub>9-11'</sub> = 2.73 Hz, J<sub>9-8'</sub> = 3.84 Hz); 8.19 (dd, 2H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-2'</sub> = 2.96 Hz, J<sub>6-5'</sub> = 3.70 Hz); 8.11 (s, NH); 7.96 (dd, 2H, H<sub>3</sub>, J<sub>3'-5'</sub> = 8.95 Hz, J<sub>3'-2'</sub> = 9.02 Hz); 7.90 (d, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8'-9'</sub> = 2.01 Hz); 7.88 (d, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub> = 2.68 Hz); 7.62 (d, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub> = 9.27 Hz); 7.54 (d, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-6</sub> = 8.40 Hz); 7.49 (dd, 2H, H<sub>5</sub>, J<sub>5'-3'</sub> = 4.21 Hz, J<sub>5'-6'</sub> = 8.77 Hz). IR ν cm<sup>-1</sup>: 3,105 (w, NH); 2,211 (w, C≡N); 1,533 (s, C=O); 1,326 (s, N<sup>+</sup>O<sup>-</sup>). Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>Cl: C: 46.88%; H: 2.79%; N: 18.23%. Found: C: 46.74%; H: 2.94%; N: 18.18%.

*2-Cyano-7-methyl-3-(4-(2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide (2)*. Yield 50%; <sup>1</sup>H-NMR δ ppm: 8.21 (d, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-6</sub> = 3.85 Hz); 8.20 (d, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub> = 1.66 Hz); 8.17 (s, 1H, NH); 7.91 (d, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub> = 2.04 Hz); 7.88 (d, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8'-9'</sub> = 2.43 Hz); 7.51 (s, 1H, H<sub>11'</sub>); 7.49 (s, 1H, H<sub>9</sub>); 3.69 (d, 2H, H<sub>2</sub>, J<sub>2'-3'</sub> = 2.66 Hz); 3.25 (dd, 2H, H<sub>6</sub>, J<sub>6'-5'</sub> = 2.65 Hz, J<sub>6'-2'</sub> = 3.11 Hz); 3.11 (d, 2H, H<sub>3</sub>, J<sub>3'-2'</sub> = 5.27 Hz); 2.56 (dd, 2H, H<sub>5</sub>, J<sub>5'-3'</sub> = 2.79 Hz, J<sub>5'-6'</sub> = 3.40 Hz); 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>). IR ν cm<sup>-1</sup>: 3,098 (w, NH); 2,231 (w, C≡N); 1,549 (s, C=O); 1,328 (s, N<sup>+</sup>O<sup>-</sup>). Anal. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>: C: 51.06%; H: 3.48%; N: 18.95%. Found: C: 51.28%; H: 3.46%; N: 19.03%.

*2-Cyano-7-fluoro-3-(4-(2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide (3)*. Yield 15%; <sup>1</sup>H-NMR δ ppm: 8.38 (dd, 2H, H<sub>3</sub>, J<sub>3'-5'</sub> = 4.94 Hz, J<sub>3'-2'</sub> = 9.74 Hz); 8.20

(dd, 2H, H<sub>2</sub>,  $J_{2-6}$  = 2.68 Hz,  $J_{2-3}$  = 3.37 Hz); 8.13 (d, 1H, H<sub>11</sub>,  $J_{11-9}$  = 1.79 Hz); 8.11 (dd, 1H, H<sub>9</sub>,  $J_{9-11}$  = 1.42 Hz,  $J_{9-8}$  = 2.01 Hz); 7.90 (d, 2H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 2.64 Hz); 7.88 (dd, 2H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-2}$  = 2.81 Hz,  $J_{6-5}$  = 1.47 Hz); 7.69 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-8}$  = 5.87 Hz,  $J_{6-5}$  = 9.23 Hz); 7.51 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-6}$  = 2.62 Hz); 7.49 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-9}$  = 2.67 Hz); 7.44 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 2.13 Hz); 3.55 (s, NH). IR  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3,108 (w, NH); 2,362 (w, C≡N); 1,533 (s, C=O); 1,321 (s, N<sup>+</sup>O<sup>-</sup>). Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>4</sub>: C: 48.36%; H: 2.87%; N: 18.80%. Found: C: 47.92%; H: 2.94%; N: 18.31%.

*6,7-Dichloro-2-cyano-3-(4-(2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide (4)*. Yield 20%; <sup>1</sup>H-NMR  $\delta$  ppm: 8.37 (d, 1H, H<sub>11</sub>,  $J_{11-9}$  = 1.47 Hz); 8.31 (s, NH); 8.25 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-5}$  = 1.98 Hz); 8.18 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-8}$  = 2.41 Hz); 7.95 (dd, 1H, H<sub>9</sub>,  $J_{9-11}$  = 3.31 Hz,  $J_{9-8}$  = 9.84 Hz); 7.88 (d, 2H, H<sub>2</sub>,  $J_{2-3}$  = 6.93 Hz); 7.73 (d, 2H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-5}$  = 1.89 Hz); 7.51 (m, 2H, H<sub>5</sub>); 3.59 (d, 2H, H<sub>3</sub>,  $J_{3-2}$  = 4.38 Hz); 1.09 (t, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-9}$  = 6.73 Hz,  $J_{8-11}$  = 6.73 Hz). IR  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3,104 (w, NH); 2,240 (w, C≡N); 1,532 (s, C=O); 1,330 (s, N<sup>+</sup>O<sup>-</sup>). Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>: C: 44.05%; H: 2.44%; N: 17.13%. Found: C: 43.87%; H: 2.50%; N: 17.36%.

*7-Chloro-2-cyano-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide (5)*. Yield 65%; <sup>1</sup>H-NMR  $\delta$  ppm: 8.13 (t, 1H, H<sub>9</sub>); 7.99 (t, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-9}$  = 9.06 Hz,  $J_{8-12}$  = 9.06 Hz); 7.78 (dd, 1H, H<sub>12</sub>,  $J_{12-8}$  = 3.86 Hz,  $J_{12-11}$  = 9.00 Hz); 7.62 (dd, 2H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-2}$  = 1.21 Hz,  $J_{6-5}$  = 8.84 Hz); 7.58 (s, NH); 7.54 (d, 2H, H<sub>3</sub>,  $J_{3-2}$  = 8.50 Hz); 7.50 (dd, 1H, H<sub>11</sub>,  $J_{11-9}$  = 2.30 Hz,  $J_{11-12}$  = 9.19 Hz); 7.41 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-8}$  = 8.44 Hz,  $J_{6-5}$  = 9.06 Hz); 7.10 (dd, 2H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-3}$  = 8.39 Hz,  $J_{5-6}$  = 9.06 Hz); 6.74 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 7.39 Hz); 3.57 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-6}$  = 1.47 Hz); 3.10 (d, 2H, H<sub>2</sub>,  $J_{2-3}$  = 5.43 Hz). IR  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3,107 (w, NH); 2,234 (w, C≡N); 1,524 (s, C=O); 1,333 (s, N<sup>+</sup>O<sup>-</sup>). Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>Cl: C: 51.16%; H: 3.24%; N: 17.05%. Found: C: 50.85%; H: 3.12%; N: 16.93%.

*2-Cyano-7-methyl-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide (6)*. Yield 23%; <sup>1</sup>H-NMR  $\delta$  ppm: 8.24 (d, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 8.08 Hz); 8.17 (d, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-5}$  = 6.82 Hz); 8.09 (s, 1H, H<sub>11</sub>); 8.02 (s, 1H, H<sub>9</sub>); 7.94 (s, NH); 7.82 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-9}$  = 9.78 Hz); 7.54 (d, 2H, H<sub>2</sub>,  $J_{2-3}$  = 2.85 Hz); 7.53 (d, 2H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-6}$  = 4.83 Hz); 7.39 (d, 1H, H<sub>12</sub>,  $J_{12-11}$  = 4.54 Hz); 7.32 (s, 1H, H<sub>8</sub>); 7.12 (d, 2H, H<sub>3</sub>,  $J_{3-2}$  = 2.91 Hz); 7.10 (d, 2H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-5}$  = 1.88 Hz); 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>). IR  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3,082 (w, NH); 2,233 (w, C≡N); 1,547 (s, C=O); 1,329 (s, N<sup>+</sup>O<sup>-</sup>). Anal. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>: C: 55.93%; H: 4.02%; N: 17.79%. Found: C: 55.67%; H: 3.88%; N: 18.27%.

*2-Cyano-7-fluoro-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide (7)*. Yield 31%; <sup>1</sup>H-NMR  $\delta$  ppm: 7.89 (dd, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-8}$  = 2.75 Hz,  $J_{5-6}$  = 8.98 Hz); 7.71 (dd, 1H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-8}$  = 2.75 Hz,  $J_{6-5}$  = 7.96 Hz); 7.67 (s, 1H, H<sub>8</sub>); 7.52 (dd, 2H, H<sub>6</sub>,  $J_{6-2}$  = 7.83 Hz,  $J_{6-5}$  = 9.14 Hz); 7.45 (s, 2H, H<sub>2</sub>); 7.38 (d, 1H, H<sub>9</sub>,  $J_{9-8}$  = 8.55 Hz); 7.10 (dd, 2H, H<sub>5</sub>,  $J_{5-3}$  = 8.94 Hz,  $J_{5-6}$  = 9.57 Hz); 6.97 (d, 1H, H<sub>11</sub>,  $J_{11-12}$  = 9.11 Hz); 6.74 (dd, 2H, H<sub>3</sub>,  $J_{3-5}$  = 7.94 Hz,  $J_{3-2}$  = 9.35 Hz); 3.70 (s, NH); 2.98 (d, 1H, H<sub>12</sub>,  $J_{12-11}$  = 7.19 Hz); 2.59 (d, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{8-9}$  = 6.56 Hz). IR  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3,106 (w, NH); 2,232 (w, C≡N); 1,532 (s, C=O); 1,332 (s, N<sup>+</sup>O<sup>-</sup>). Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>F<sub>4</sub>: C: 52.94%; H: 3.36%; N: 17.64%. Found: C: 52.53%; H: 3.32%; N: 17.76%.

*6,7-Dichloro-2-cyano-3-(4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)piperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide (8)*. Yield 17%; <sup>1</sup>H-NMR  $\delta$  ppm: 8.31 (s, 1H, H<sub>5</sub>); 7.88 (s, 1H, H<sub>8</sub>); 7.73 (d, 2H, H<sub>6</sub>,

$J_{6-5'} = 1.75$  Hz); 7.54 (dd, 2H,  $H_{3'}$ ,  $J_{3'-5'} = 3.60$  Hz,  $J_{3'-2'} = 9.32$  Hz); 7.11 (dd, 2H,  $H_{5'}$ ,  $J_{5'-3'} = 4.68$  Hz,  $J_{5'-6'} = 8.37$  Hz); 6.74 (dd, 1H,  $H_{8'}$ ,  $J_{8'-12'} = 5.93$  Hz,  $J_{8'-9'} = 8.95$  Hz); 3.68 (dd, 1H,  $H_{12'}$ ,  $J_{12'-8'} = 2.93$  Hz,  $J_{12'-11'} = 5.26$  Hz); 3.57 (s, NH); 3.10 (dd, 2H,  $H_{2'}$ ,  $J_{2'-6'} = 3.92$  Hz,  $J_{2'-3'} = 5.90$  Hz); 2.59 (d, 1H,  $H_{9'}$ ,  $J_{9'-8'} = 1.89$  Hz); 2.48 (dd, 1H,  $H_{11'}$ ,  $J_{11'-9'} = 1.55$  Hz,  $J_{11'-12'} = 2.72$  Hz). IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3,111 (w, NH); 2,364 (w,  $\text{C}\equiv\text{N}$ ); 1,525 (s,  $\text{C}=\text{O}$ ); 1,331 (s,  $\text{N}^+\text{O}^-$ ). Anal. Calc. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_3\text{F}_3\text{Cl}_2$ : C: 47.81%; H: 2.84%; N: 15.93%. Found: C: 47.32%; H: 2.97%; N: 16.07%.

*2-Cyano-3-(4-(4-fluorophenyl)piperazine-1-carboxamido)-7-methylquinoxaline 1,4-dioxide (9)*. Yield 79%;  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$  ppm: 8.23 (d, 1H,  $H_5$ ,  $J_{5-6} = 8.39$  Hz); 8.16 (s, 1H,  $H_9$ ); 7.94 (s, 1H,  $H_{11}$ ); 7.81 (d, 1H,  $H_6$ ,  $J_{6-5} = 8.46$  Hz); 7.52 (d, 1H,  $H_{8'}$ ,  $J_{8'-9'} = 8.36$  Hz); 7.39 (s, 1H,  $H_8$ ); 7.33 (s, 1H, NH); 7.17 (d, 1H,  $H_{12'}$ ,  $J_{12'-11'} = 8.17$  Hz); 7.08 (d, 2H,  $H_{2'}$ ,  $J_{2'-3'} = 6.02$  Hz); 7.06 (d, 2H,  $H_{6'}$ ,  $J_{6'-5'} = 7.13$  Hz); 7.01 (d, 2H,  $H_{3'}$ ,  $J_{3'-2'} = 4.73$  Hz); 6.99 (d, 2H,  $H_{5'}$ ,  $J_{5'-6'} = 6.17$  Hz); 3.19 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-C}_7$ ). IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3,079 (w, NH); 2,231 (w,  $\text{C}\equiv\text{N}$ ); 1,538 (s,  $\text{C}=\text{O}$ ); 1,344 (s,  $\text{N}^+\text{O}^-$ ). Anal. Calc. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_3\text{F}$ : C: 59.71%; H: 4.50%; N: 19.90%. Found: C: 59.80%; H: 4.55%; N: 19.51%.

*2-Cyano-7-fluoro-3-(4-(4-fluorophenyl)piperazine-1-carboxamido)quinoxaline 1,4-dioxide (10)*. Yield 23%;  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$  ppm: 8.41 (d, 1H,  $H_5$ ,  $J_{5-6} = 5.14$  Hz); 8.38 (d, 1H,  $H_6$ ,  $J_{6-5} = 5.96$  Hz); 8.14 (s, 1H,  $H_9$ ); 8.12 (s, 1H,  $H_{11'}$ ); 7.91 (t, 2H,  $H_{5'}$ ,  $J_{5'-6'} = 8.92$  Hz,  $J_{5'-3'} = 8.92$  Hz); 7.45 (s, 1H,  $H_8$ ); 7.10 (s, 1H,  $H_8$ ); 7.07 (s, 2H,  $H_{2'}$ ); 7.05 (s, 1H,  $H_{12'}$ ); 7.01 (d, 2H,  $H_{3'}$ ,  $J_{3'-2'} = 3.69$  Hz); 7.00 (d, 2H,  $H_{6'}$ ,  $J_{6'-5'} = 3.25$  Hz); 6.99 (s, 1H, NH). IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3,109 (w, NH); 2,231 (w,  $\text{C}\equiv\text{N}$ ); 1,534 (s,  $\text{C}=\text{O}$ ); 1,354 (s,  $\text{N}^+\text{O}^-$ ). Anal. Calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_3\text{F}_2$ : C: 56.33%; H: 3.75%; N: 19.71%. Found: C: 55.84%; H: 3.68%; N: 19.53%.

*7-Chloro-2-cyano-3-(4-(4-methoxyphenyl)piperazine-1-carboxamido)quinoxaline 1,4-dioxide (11)*. Yield 12%;  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$  ppm: 8.24 (s, 1H,  $H_8$ ); 8.19 (d, 1H,  $H_6$ ,  $J_{6-5} = 8.47$  Hz); 8.13 (d, 1H,  $H_5$ ,  $J_{5-6} = 8.63$  Hz); 8.07 (s, 1H, NH); 7.90 (d, 1H,  $H_{9'}$ ,  $J_{9'-8'} = 7.83$  Hz); 7.63 (d, 1H,  $H_{12'}$ ,  $J_{12'-11'} = 6.55$  Hz); 7.58 (s, 1H,  $H_{11'}$ ); 7.53 (d, 1H,  $H_{8'}$ ,  $J_{8'-9'} = 8.73$  Hz); 6.93 (d, 2H,  $H_{6'}$ ,  $J_{6'-5'} = 6.87$  Hz); 6.91 (d, 2H,  $H_{2'}$ ,  $J_{2'-3'} = 3.39$  Hz); 6.84 (d, 2H,  $H_{3'}$ ,  $J_{3'-2'} = 7.41$  Hz); 6.82 (d, 2H,  $H_{5'}$ ,  $J_{5'-6'} = 6.48$  Hz); 3.63 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ). IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3,115 (w, NH); 2,228 (w,  $\text{C}\equiv\text{N}$ ); 1,540 (s,  $\text{C}=\text{O}$ ); 1,351 (s,  $\text{N}^+\text{O}^-$ ). Anal. Calc. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_4\text{Cl}$ : C: 55.44%; H: 4.18%; N: 18.48%. Found: C: 54.97%; H: 3.95%; N: 18.21%.

*2-Cyano-3-(4-(4-methoxyphenyl)piperazine-1-carboxamido)-7-methylquinoxaline 1,4-dioxide (12)*. Yield 32%;  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$  ppm: 8.02 (d, 1H,  $H_5$ ,  $J_{5-6} = 8.69$  Hz); 7.94 (d, 1H,  $H_8$ ,  $J_{8-6} = 2.45$  Hz); 7.61 (dd, 1H,  $H_{12'}$ ,  $J_{12'-8'} = 1.78$  Hz,  $J_{12'-11'} = 8.64$  Hz); 7.52 (d, 1H,  $H_6$ ,  $J_{6-5} = 8.61$  Hz); 7.39 (d, 2H,  $H_{5'}$ ,  $J_{5'-6'} = 3.60$  Hz); 7.32 (s, 2H,  $H_{6'}$ ); 7.27 (dd, 1H,  $H_{8'}$ ,  $J_{8'-12'} = 1.61$  Hz,  $J_{8'-9'} = 8.82$  Hz); 6.92 (d, 1H,  $H_{9'}$ ,  $J_{9'-8'} = 8.44$  Hz); 6.84 (d, 2H,  $H_{3'}$ ,  $J_{3'-2'} = 8.67$  Hz); 3.69 (t, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ,  $J_{7-8} = 3.39$  Hz,  $J_{7-6} = 3.39$  Hz); 3.62 (s, 2H,  $H_{2'}$ ); 3.13 (s, 1H, NH); 2.55 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-C}_7$ ); 1.23 (s, 1H,  $H_{11'}$ ). IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3,120 (w, NH); 2,230 (w,  $\text{C}\equiv\text{N}$ ); 1,546 (s,  $\text{C}=\text{O}$ ); 1,328 (s,  $\text{N}^+\text{O}^-$ ). Anal. Calc. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_4$ : C: 60.82%; H: 5.06%; N: 19.35%. Found: C: 61.20%; H: 4.61%; N: 19.84%.

*6-7-Dichloro-2-cyano-3-(4-(4-methoxyphenyl)piperazine-1-carboxamido)quinoxaline 1,4-dioxide (13)*. Yield 11%;  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$  ppm: 8.46 (d, 1H,  $H_{8'}$ ,  $J_{8'-9'} = 8.85$  Hz); 8.29 (s, 1H, NH); 8.19 (d, 1H,  $H_{12'}$ ,  $J_{12'-11'} = 1.33$  Hz); 7.87 (s, 1H,  $H_8$ ); 7.73 (d, 2H,  $H_{6'}$ ,  $J_{6'-5'} = 2.11$  Hz); 6.94 (s, 1H,  $H_5$ ); 6.91 (s, 1H,

H<sub>9</sub>); 6.85 (s, 1H, H<sub>11'</sub>); 6.83 (s, 2H, H<sub>2</sub>); 3.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O); 3.18 (d, 2H, H<sub>3</sub>,  $J_{3'-2'} = 3.00$  Hz); 3.17 (d, 2H, H<sub>5</sub>,  $J_{5'-6'} = 2.12$  Hz). IR  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3,115 (w, NH); 2,229 (w, C≡N); 1,542 (s, C=O); 1,352 (s, N<sup>+</sup>O<sup>-</sup>). Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>: C: 51.53%; H: 3.68%; N: 17.17%. Found: C: 51.05%; H: 3.49%; N: 17.02%.

### 3.2. Pharmacology

#### 3.2.1. *In Vitro* Antiplasmodial Drug Assay

Chloroquine resistant FCR-3 strain of *P. falciparum* was cultivated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> environment on glucose-enriched RPMI 1640 medium supplemented with gentamicin 0.1 mg/mL and 10% heat-inactivated A+ human serum, as previously described [23]. The drugs, dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO), were added at final concentrations ranging from 250 to 0.1 μM. The final DMSO concentration was never greater than 0.1%. *In vitro* antimalarial activity was measured using the [3H]-hypoxanthine (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) incorporation assay [24]. Briefly, 250 μL of total culture medium with the diluted drug and the suspension of human red blood cell in medium (A<sup>+</sup> group, 5% haematocrit) with 1% parasitaemia, were placed into the wells of 96-well microtitre plates. After 48 h of incubation at 37 °C in a 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> atmosphere. On the third day of the test, radioactivity was assessed. All experiments were performed in triplicate. Results were expressed as the concentration resulting in 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) which was calculated by a nonlinear regression logistic dose response model; the mean IC<sub>50</sub> values and standard deviation for each compound was calculated.

#### 3.2.2. *In Vitro* Cytotoxicity

Toxicity was determined using Vero cells (normal monkey kidney cells) cultured under the same conditions as *P. falciparum*, except for the replacement of 5% human serum with 10% fetal calf serum. After the addition of compounds at increasing concentrations, cell growth was measured by [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine incorporation after a 48-hour incubation period and then compared with a control sample [25].

#### 3.2.3. *In Vitro* Antileishmanial Drug Assay

Leishmanicidal activity was determined on axenic cultures of *L. infantum* amastigotes. In order to estimate the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the drugs, the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) micromethod was used as previously described [26].

Briefly, Leishmania strain was maintained in promastigote stage in a biphasic medium (blood agar with 0.89% NaCl, pH 7.4) at 24 °C, with sub-passage every 3–4 days. Promastigotes ( $5 \times 10^6$  parasites) were then transferred in M199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, pH 7.4. After 4 days, exponential phase promastigotes were centrifuged for 10 min at 1,500 g and 4 °C. The supernatant was discarded and replaced by fresh M199 medium supplemented with 20% FBS, pH 5.5. Axenic amastigotes transformation was then induced by increasing the temperature to 34 °C. Drugs were then tested at increasing concentrations.



#### 4. Conclusions

All the tested compounds were almost 100 times less active against *Plasmodium* than chloroquine. Consequently they did not deserve further examination as antimalarials. Against *Leishmania* compounds **5** and **8** showed good activity and the most cytotoxic compound is four times less toxic than the reference drug. Unfortunately, these compounds show a low selectivity index. In this context, we suggest that synthesis should be focused on compounds with halogens at R<sup>7</sup> and/or R<sup>6</sup> in order to improve activity and lower toxicity.

#### Acknowledgments

Carlos Barea is indebted to the Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra (Spain) for a PhD scholarship.

#### References

1. Vicente, E.; Charnaud, S.; Bongard, E.; Villar, R.; Burguete, A.; Solano, B.; Ancizu, S.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Vivas, L.; *et al.* Synthesis and Antiplasmodial Activity of 3-Furyl and 3-Thienylquinoxaline-2-carbonitrile 1,4-Di-*N*-oxide Derivatives. *Molecules* **2008**, *13*, 69–77.
2. WHO. World Malaria Report 2011. Available online: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/index.html](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/index.html) (accessed on 11 June 2011).
3. WHO. Leishmaniasis. Available online: <http://www.who.int/entity/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/> (accessed on 11 June 2011)
4. Palumbo, E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: A brief review. *Braz. J. Infect. Dis.* **2008**, *12*, 2–4.
5. Lima, L.M.; Barreiro, E.J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23–49.
6. Carta, A.; Corona, P.; Loriga, M. Quinoxaline 1,4-dioxide: A versatile scaffold endowed with manifold activities. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2259–2272.
7. Monge, A.; Palop, J.A.; Piñol, A.; Martínez-Crespo, F.J.; Narro, S.; González, M.; Sáinz, Y.; López de Ceráin, A.; Hamilton, E.; Barker, A.J. 3-Amino-2-Quinoxalinecarbonitrile. New Fused Quinoxaline with Potential Cytotoxic Activity. *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 1135–1139.
8. Burguete, A.; Estevez, Y.; Castillo, D.; González, G.; Villar, R.; Solano, B.; Vicente, E.; Pérez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A.; *et al.* Anti-leishmanial and structure-activity relationship of ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-*N*-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2008**, *103*, 778–780.
9. Estevez, Y.; Quiliano, M.; Burguete, A.; Zimic, M.; Málaga, E.; Verástegui, M.; Pérez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A.; Castillo, D.; *et al.* Trypanocidal properties, structure-activity relationship and computational studies of quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives. *Experiment. Parasitol.* **2011**, *127*, 745–751.

10. Ancizu, S.; Moreno, E.; Torres, E.; Burguete, A.; Perez-Silanes, S.; Benitez, D.; Villar, R.; Solano, B.; Marin, A.; Aldana, I.; *et al.* Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-*N*-oxidequinoxalin-2-yl)amide derivatives as hits for the development of neglected diseases drugs. *Molecules* **2009**, *14*, 2256–2272.
11. Marin, A.; Lima, L.M.; Solano, B.; Vicente, E.; Pérez-Silanes, S.; Maurel, S.; Sauvain, M.; Aldana, I.; Monge, A.; Deharo, E. Antiplasmodial structure-activity relationship of 3-trifluoromethyl-2-arylcarbonylquinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives. *Experiment. Parasitol.* **2008**, *118*, 25–31.
12. Vicente, E.; Lima, L.M.; Bongard, E.; Charnaud, S.; Villar, R.; Solano, B.; Burguete, A.; Pérez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A. Synthesis and structure-activity relationship of 3-phenylquinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives as antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1903–1910.
13. Zarranz, B.; Jaso, A.; Lima, L.M.; Aldana, I.; Monge, A.; Maurel, S.; Sauvain, M. Antiplasmodial activity of 3-trifluoromethyl-2-carbonylquinoxaline di-*N*-oxide derivatives. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2006**, *42*, 357–361.
14. Zarranz, B.; Jaso, A.; Aldana, I.; Monge, A.; Maurel, S.; Deharo, E.; Jullian, V.; Sauvain, M. Synthesis and antimalarial activity of new 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile derivatives. *Arzneimittelforschung* **2005**, *55*, 754–761.
15. Aldana, I.; Ortega, M.A.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Oporto, P.; Gimenez, A.; Monge, A.; Deharo, E. Anti-malarial activity of some 7-chloro-2-quinoxalinecarbonitrile-1,4-di-*N*-oxide derivatives. *Pharmazie* **2002**, *58*, 68–69.
16. Barea, C.; Pabón, A.; Castillo, D.; Zimic, M.; Quiliano, M.; Galiano, S.; Pérez-Silanes, S.; Monge, A.; Deharo, E.; Aldana, I. New salicylamide and sulfonamide derivatives of quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide with antileishmanial and antimalarial activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4498–4502.
17. Cunico, W.; Gomes, C.R.; Facchinetti, V.; Moreth, M.; Penido, C.; Henriques, M.G.; Varotti, F.P.; Krettli, L.G.; Krettli, A.U.; da Silva, F.S.; *et al.* Synthesis, antimalarial evaluation and molecular modeling studies of hydroxyethylpiperazines, potential aspartyl protease inhibitors, part 2. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3816–3820.
18. Mendoza, A.; Pérez-Silanes, S.; Quiliano, M.; Pabón, A.; Galiano, S.; González, G.; Garavito, G.; Zimic, M.; Vaisberg, A.; Aldana, I.; *et al.* Aryl piperazine and pyrrolidine as antimalarial agents. Synthesis and investigation of structure-activity relationships. *Exp. Parasitol.* **2011**, *128*, 97–103.
19. Ortega, M.A.; Sainz, Y.; Montoya, M.E.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Aldana, I.; Monge, A. Anti-Myco bacterium tuberculosis agents derived from quinoxaline-2-carbonitrile and quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-*N*-oxide. *Arzneimittelforschung* **2002**, *52*, 113–119.
20. González, M.; Cerecetto, H. Benzofuroxan and Furoxan. Chemistry and Biology. In *Topics in Heterocyclic Chemistry. Bioactive Heterocycles V*; Khan, M.T.H., Ed.; Springer: Berlin, Germany, 2007; Volume 10, pp. 265–308.
21. Ley, K.; Seng, F. Synthesis unter verwendung von benzofuroxan. *Synthesis* **1975**, *7*, 415–422.
22. Keizer, H.M.; Sijbesma, R.P.; Meijder, E.W. The convenient synthesis of hydrogen-bonded ureidopyrimidiones. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2553–2555.

23. Desjardins, R.E.; Canfield, C.J.; Haynes, J.D.; Chulay, J.D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710–718.
24. Sereno, D.; Lemesre, J.L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigotes stage of *Leishmania amazonensis in vitro*. *Parasitol. Res.* **1997**, *83*, 401–403.
25. Cachet, N.; Hoakwie, F.; Bertani, S.; Bourdy, G.; Deharo, E.; Stien D.; Houel, E.; Gornitzka, H.; Fillaux, J.; Chevalley, S.; *et al.* Antimalarial activity of simalikalactone E, a new quassinoid from *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 4393–4398.
26. Muñoz, V.; Sauvain, M.; Mollinedo, P.; Callapa, J.; Rojas, I.; Gimenez, A.; Valentin, A.; Mallie, M. Antimalarial activity and cytotoxicity of (–)-roemrefidine isolated from the stem bark of *Sparattanthelium amazonum*. *Planta Med.* **1999**, *65*, 448–449.

*Sample Availability:* Samples of the compounds are available from the authors.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).